



Universidade de Aveiro

Ano 2014

Departamento de Química

SÍLVIA  
ABRANTES REIS

## **INATIVAÇÃO DO BACTERIÓFAGO T4 POR ALTA PRESSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Adelaide Almeida, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e do Doutor Jorge Saraiva, Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho à minha mãe, por ser a mulher que é e por fazer de mim tudo aquilo que sou.

**o júri**

**Presidente do júri**

**Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues**

Professora auxiliar com agregação

Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Vogais**

**Doutora Ana Sofia Duarte (arguente)**

Professora auxiliar convidada

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida (orientadora)**

Professora auxiliar

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Professora Doutora Adelaide Almeida, orientadora da tese, pelo apoio, oportunidades e disponibilidade.

Ao Doutor Jorge Saraiva pela partilha de conhecimentos e pelo apoio.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente à Carla e à Inês por todo o conhecimento transmitido e por tornarem o trabalho mais fácil.

À minha família pela paciência e pelo apoio nos melhores e nos piores momentos.

Um obrigada muito especial à Marlene, à Daniela e à Fátima pela história que estamos a construir desde 2008. Sem vocês não tinha sido a mesma coisa.

Um muito obrigada também ao João e ao Pedro pelo apoio e acompanhamento nesta fase.

À minha Mãe, o meu pilar. Obrigada por nunca teres desistido de mim e por nunca me teres deixado desistir de mim. Um obrigada muito especial por não teres perdido a paciência comigo, mesmo naqueles momentos em que nem eu me consigo suportar.

Sílvia Reis

**Palavras-chave**

alta pressão; inativação de vírus; bacteriófagos, alimentos; valor de D e z

**Resumo**

Os bacteriófagos são vírus que infetam bactérias e que podem provocar a sua lise. São classificados de acordo com a sua morfologia e tipo de material genético, podendo ser utilizados como modelos para o estudo do comportamento dos vírus de células animais em determinadas condições, como é o caso do uso da técnica de alta pressão para inativação viral.

A alta pressão é um processo não térmico aplicável na indústria alimentar para conservação de alimentos e consiste na aplicação de pressão durante um determinado tempo de processamento a uma temperatura variável. Mantendo a temperatura constante, como no caso deste trabalho, o aumento dos fatores pressão e tempo de processamento levam a um aumento da taxa de inativação viral.

Neste trabalho foi ainda estudado o efeito de fatores associados ao ambiente em que o vírus se encontra, nomeadamente os valores de pH e concentração de sal. O aumento dos valores destes dois parâmetros apresentou um efeito antagónico, ou seja, um aumento do pH potenciou a inativação viral pela técnica de alta pressão, enquanto o aumento da concentração de NaCl dificultou essa mesma inativação.

Foi calculado o valor de D para cada uma das pressões testadas. Os valores de  $D_1$  variaram entre 0,21 e 6,65 minutos e os valores de  $D_2$  variaram entre 2,37 e 77,02 minutos, concluindo-se que a redução do título viral foi mais acentuada nos primeiros minutos de tratamento do que em tempos mais longos.

Para z foram obtidos valores de 107,53 MPa para a primeira fase da curva e 117,65 MPa para a segunda.

Como conclusão podemos dizer que: i) valores altos de pressão combinados com tempos curtos de tratamento são mais eficientes na inativação de fagos de DNA sem invólucro que longos tempos combinados com baixos valores de pressão; ii) a inativação viral é mais eficiente a valores de pH elevados mas é menos eficaz a valores de NaCl elevados; iii) o perfil de inativação com o tempo apresenta um comportamento de duas fases, cada uma com uma cinética de inativação de primeira ordem.

**Keywords**

high pressure; virus inactivation; bacteriophages; food; D and z value

**Abstract**

Bacteriophages are viruses that infect bacteria and can cause their lysis. They are classified according to their morphology and type of genetic material, and can be used as models to study the behavior of the animal virus under certain conditions, such as the use of high pressure to inactivate viruses.

High pressure is a non-thermal process that can be applicable in the food industry for food preservation and involves the application of pressure during a given processing time at a certain temperature. When it is used a constant temperature, as was done in this work, the increase in pressure values and in treatment times lead to an increase in the level of viral inactivation. The increase in treatment times causes a viral reduction with a logarithmic double behavior.

The effect of physical and chemical properties of the environment where the microorganism growth, like the pH value and salt concentration, was also studied. The increase in the values of these parameters has an antagonistic effect, an increase in pH value leads to an increase in viral inactivation by high pressure technique, while increasing the NaCl concentration hampers the same inactivation.

The  $D_1$  values ranged between 0,21 and 6,65 minutes and the  $D_2$  values varied between 2,37 and 77,02 minutes, since the reduction in viral titer was more pronounced in the first minutes of treatment than in longer times.

For z value were obtained values of 107,53 MPa for the first phase of the curve and 117,65 MPa for the second.

In conclusion we can say that: i) high pressure combined with short treatment times are more efficient in the inactivation of non-enveloped DNA phages than long times combined with low pressure values; ii) viral inactivation is most effective at high pH values but is less effective with high amounts of NaCl; iii) the inactivation profile as a function of the pressure holding time showed two inactivation phases, each with a first order inactivation.





## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Bacteriófagos .....	2
1.1.1	Composição e estrutura.....	4
1.1.2	Classificação .....	6
1.1.3	Ciclo de Multiplicação.....	8
1.1.4	Bacteriófago T4: .....	10
1.2	Conservação de alimentos .....	13
1.2.1	Processamento térmico .....	15
1.3	Alta pressão Hidrostática .....	16
1.3.1	Alta pressão na conservação de alimentos: .....	16
1.3.2	Equipamentos e processo:.....	17
1.3.3	Princípios da técnica: .....	20
1.3.4	Inativação de vírus por Alta pressão.....	21
1.3.5	Parâmetros que influenciam a inativação de vírus por alta pressão .....	23
1.4	Objetivos .....	30
2	Materiais e Métodos .....	31
3	Resultados .....	31
4	Discussão.....	31
5	Conclusões .....	31
6	Bibliografia.....	31
7	Anexos.....	31

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da estrutura base de um bacteriófago com cauda.....	4
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das variações morfológicas dos bacteriófagos.....	6
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos bacteriófagos.....	10
<b>Figura 4:</b> Aplicação do método de alta pressão em diferentes tipos de alimentos no ano 2010.....	17
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do equipamento de alta pressão.....	19
<b>Figura 6:</b> Evolução do número de equipamentos de alta pressão existentes na indústria alimentar a nível mundial entre 1990 e 2010.....	20
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica da influência da percentagem de NaCl (0; 0,8; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20%) na inativação do bacteriófago T4 por alta pressão.....	39
<b>Figura 8:</b> Representação gráfica da influência do valor de pH (3, 5, 7, 7,4, 9, 11) na inativação do bacteriófago T4 por alta pressão.....	40
<b>Figura 9:</b> Representação gráfica de log(D) em função da pressão.....	42

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos bacteriófagos em famílias.....	7
<b>Tabela 2:</b> Métodos de conservação de alimentos.....	14
<b>Tabela 3:</b> Resultados de estudos de inativação de vírus de células animais processados por alta pressão.....	22
<b>Tabela 4:</b> Resultados de estudos de inativação de bacteriófagos processados por alta pressão.....	23
<b>Tabela 5:</b> Resultados de estudos da influência da temperatura na inativação de vírus por alta pressão.....	25
<b>Tabela 6:</b> Resultados de estudos da influência da pressão e tempo de processamento na inativação de vírus por alta pressão.....	27
<b>Tabela 7:</b> Resultados de estudos da influência do pH na inativação de vírus por alta pressão.....	28
<b>Tabela 8:</b> Resultados de estudos da influência da percentagem de NaCl na inativação de HAV pelo tratamento de alta pressão.....	30
<b>Tabela 9:</b> Condições usadas no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento na inativação do bacteriófago T4.....	33
<b>Tabela10:</b> Influência da pressão e tempo de processamento no título do bacteriófago T4.....	36
<b>Tabela 11:</b> Valores do coeficiente da reação (k) e valores de D e z.....	41
<b>Tabela 12:</b> Valores de D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub> obtidos para <i>Salmonella typhimurium</i> a várias pressões...	50

## **Abreviaturas e acrónimos**

**AiV** Aichi Virus

**ATCC** *American Type Culture Collection*

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**ds** *double strand*

**FCV** *Feline Calicivirus*

**FMDV** *Food and Mouth Disease Virus*

**HAdV** *Human Adenovirus*

**HAV** Vírus da hepatite A

**HNoV** *Human Norovirus*

**HPP** *High Pressure Processing*

**HRV** *Human Rotavirus*

**MNV** *Murine Norovirus*

**MPa** MegaPascal

**PBS** *Phosphate Buffered Saline*

**PV** *Pliovirus*

**RNA** Ácido Ribonucleico

**rpm** rotações por minuto

**ss** *single strand*

**TSA** *Tryptic Soy Agar*

**TSB** *Tryptic Soy Broth*

**TV** *Tulane Virus*

**UFP** Unidades Formadoras de Placa

**UV** Ultra Violeta

# **[ 1 Introdução ]**

Os vírus são responsáveis por mais de 67% das doenças causadas por ingestão de alimentos ou águas contaminados. O consumo de alimentos contaminados com vírus é normalmente acompanhado de sintomas como febre, náuseas, vômitos e diarreia o que torna necessário o controlo dos seus teores de forma a torná-los seguros para o consumo humano [1, 2]. Assim, para controlar os microrganismos que degradam os alimentos e os tornam inseguros para consumo têm sido desenvolvidas novas técnicas de conservação com aplicação na indústria alimentar, como é o caso da alta pressão. Esta técnica pode ser aplicada durante diferentes fases do processamento desde facilitar a separação das conchas de bivalves até eliminar os microrganismos existentes no alimento [3]. O efeito da alta pressão na inativação de bactérias e protozoários já está bastante estudado mas o efeito na inativação de vírus está menos desenvolvido devido à sua deteção ser difícil [4]. Estas dificuldades são devidas ao facto de os vírus serem difíceis de cultivar em laboratório sendo necessário recorrer-se a modelos como os bacteriófagos. No entanto, para serem considerados bons modelos, este tipo de vírus têm de apresentar uma resposta ao tratamento por alta pressão semelhante ao vírus de células animais em estudo. Esta resposta depende do tipo de vírus, dos parâmetros de processamento e ainda do ambiente em que o alimento se encontra [5, 6].

## **1.1 Bacteriófagos**

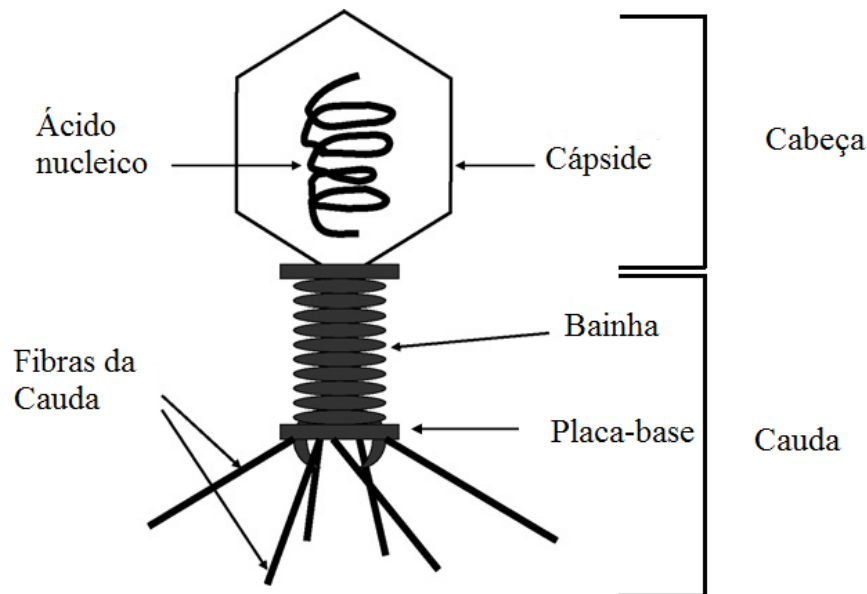
Os bacteriófagos foram descobertos por Frederick William Twort em 1915 [7] e codescobertos por Félix d'Herelle em 1917 que lhes conferiu este nome [8]. A designação bacteriófago, ou simplesmente fago [9] significa “comedor de bactérias” e refere-se ao facto de estes vírus terem a capacidade de promoverem a lise das bactérias que infetam [10]. Esta propriedade dos fagos permitiu que fossem usados no combate a infeções bacterianas desde que foram descobertos [10-12].

Tal como os outros vírus, os fagos são parasitas intracelulares obrigatórios [7, 13] que infetam as bactérias que possuem os recetores específicos para a sua ligação [10, 11, 14].

Estima-se que existam cerca de  $10^{32}$  fagos no planeta distribuídos pelos mais variáveis ecossistemas [9, 15]. Esta distribuição generalizada é possível devido ao facto de

estes vírus serem bastante resistentes e adaptáveis aos fatores naturais ambientais, como a luz do sol e a temperatura [16].

Por serem incapazes de se desenvolver fora de células, não é possível cultivar vírus em meios de cultura sem um hospedeiro. Pela dificuldade e morosidade de fazer crescer em laboratório linhas celulares de mamíferos, os bacteriófagos são muitas vezes usados como modelos para vírus de mamíferos em pesquisas laboratoriais [17]. Os fagos apresentam um comportamento semelhante ao dos vírus de mamíferos quando expostos a diferentes condições [16], apresentando, no entanto, algumas vantagens sobre estes últimos: i) os métodos de detecção são mais simples, rápidos e baratos quando comparados com a utilização de vírus que infetam células de mamíferos, não exigindo equipamentos e instalações complexos como os usados para a propagação de vírus de células animais; ii) não são patogênicos para os humanos; iii) têm uma taxa de crescimento mais elevada que a maioria dos vírus que infetam mamíferos, conseguindo-se operar com estes a um título mais elevado o que permite uma maior fiabilidade dos resultados; iv) os resultados dos ensaios com fagos estão prontos em algumas horas após inoculação em vez de dias ou semanas como no caso dos vírus que infetam células de mamíferos [17].



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura base de um bacteriófago com cauda (adaptado de [18]).

### 1.1.1 Composição e estrutura

Os bacteriófagos possuem como genoma DNA ou RNA [16], de cadeia simples ou dupla [8] envolvido por uma camada proteica (cápside) que pode ou não estar envolvida por um invólucro lipídico [19, 20], formando uma estrutura designada por cabeça [18]. Ligada à cabeça pode existir uma estrutura designada por cauda, que engloba a bainha, a placa-base e pode ainda conter fibras na cauda [21]. Na Figura 1 está representado esquematicamente a estrutura de um bacteriófago com cauda.

#### 1.1.1.1 Cabeça

A cabeça do bacteriófago é constituída pelo material genético do vírus e pela estrutura que o protege conhecida como cápside. A cápside viral é uma estrutura que pode apresentar-se de várias formas e tamanhos [7], sendo composta por múltiplas cópias de uma ou várias proteínas diferentes [20], que formam subunidades designadas por protómeros. A junção desses protómeros por ligações não covalentes gera complexos proteicos maiores designados por capsómeros, que no seu conjunto formam a cápside [22].



Em termos de funções, esta estrutura viral está diretamente envolvida na proteção do material genético e na penetração do vírus na célula hospedeira por estabelecimento de interações com a membrana do hospedeiro e regulando a sua entrada no mesmo [7].

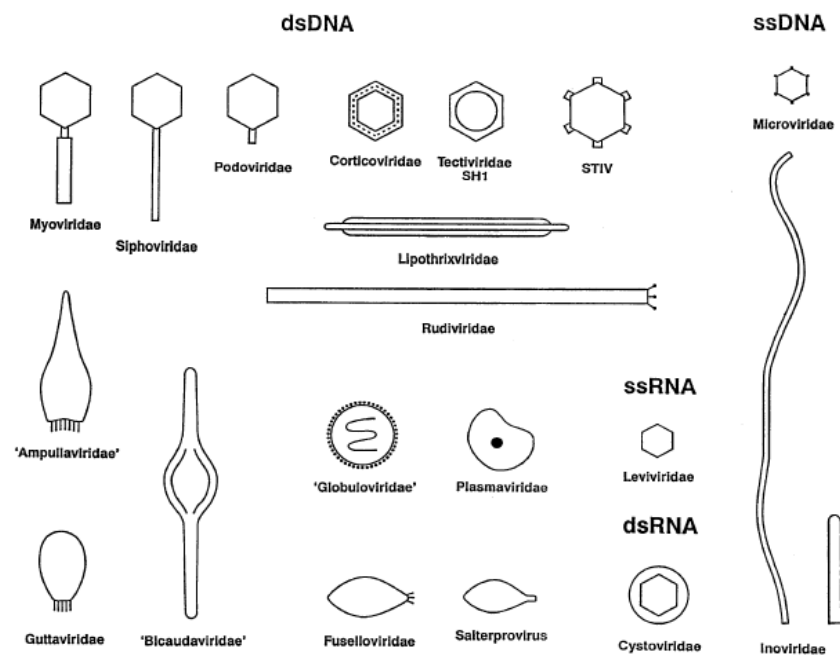
No geral existem três morfologias diferentes da cápside: i) cápside icosaédrica que é a forma mais comum na natureza e pode aparecer na forma pentamérica ou hexamérica, dependendo se possui cinco ou seis protómeros, respetivamente a formarem os capsómeros; ii) helicoidal que é formada apenas por um tipo de protómeros que ao se associarem em espiral formam um tubo longo; iii) complexas que são aquelas que não se enquadram em nenhuma das anteriores. A sua simetria é considerada binária pois é uma conjugação das estruturas das cápsides icosaédrica e helicoidal [22, 23].

#### 1.1.1.2 Cauda

A grande maioria dos fagos apresenta uma cauda que é formada por um tubo oco que serve de canal de passagem do material genético viral durante o processo de infeção, pois é nela que se encontram as proteínas que reconhecem os recetores de ligação da célula hospedeira [14, 22, 24]. A cauda apresenta-se de várias formas, podendo ser ou não contráctil [22, 24, 25]. No caso de fagos mais complexos, a cauda pode ainda ser envolta por uma bainha contráctil e apresentam no final da cauda uma placa-base e uma ou mais fibras ligadas a ela. Quando estas estruturas estão presentes estão também envolvidas no reconhecimento e ligação do fago à célula hospedeira [18, 21]. No caso dos fagos mais simples, em que estes componentes estão em falta, as suas funções são levadas a cabo por outras estruturas, nomeadamente a cápside [25, 26].

### 1.1.2 Classificação

Devido ao seu elevado número e diversidade, os bacteriófagos são classificados em 13 famílias de acordo com a sua morfologia, o seu tipo de ácido nucleico e ainda tendo em conta se possuem ou não um invólucro lipídico [8, 27]. Na Figura 2 estão representadas de forma esquemática as diferentes morfologias que os fagos podem apresentar e na Tabela 1 é apresentada a classificação em famílias dos fagos consoante as suas características.



**Figura 2:** Representação esquemática das variações morfológicas dos bacteriófagos [8, 27].

**Tabela 1:** Classificação dos bacteriófagos em famílias (adaptada de [18]).

Nome da família	Morfologia	Genoma	Exemplos
<b>Corticoviridae</b>	Cápside icosaédrica com camada lipídica	dsDNA	PM2
<b>Cystoviridae</b>	Invólucro, cápside icosaédrica, lípidos	dsRNA	Φ 6
<b>Fuselloviridae</b>	Pleomórfico, invólucro, lípidos, sem cápside	dsDNA	SSV1
<b>Inoviridae</b>	Em forma de bastonete com simetria helicoidal	ssDNA	fd/MVL1
<b>Leviviridae</b>	Cápside quase-icosaédrica	ssRNA	MS2
<b>Lipothrixviridae</b>	Cápside quase-icosaédrica	dsDNA	TTV1
<b>Microviridae</b>	Filamentos com envelope, lípidos	ssDNA	Φ X174
<b>Myoviridae</b>	Cauda contráctil	dsDNA	T4
<b>Plasmaviridae</b>	Pleomórfico, invólucro, lípidos, sem cápside	dsDNA	L2
<b>Podoviridae</b>	Curto, cauda não contráctil	dsDNA	T7
<b>Rudiviridae</b>	Bastonetes helicoidais	dsDNA	SIRV-1
<b>Siphoviridae</b>	Longo, cauda não contráctil	dsDNA	λ
<b>Tectiviridae</b>	Cápside icosaédrica com vesícula lipoproteína interna	dsDNA	PRD1

Das 13 famílias em que se dividem os fagos, existem três que são as mais comuns e que abrangem cerca de 96% de todos os fagos conhecidos, que são a *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* [8, 19, 27]. Os fagos pertencentes a estas três famílias possuem cauda, que pode ser longa e contráctil, cauda longa não contráctil e cauda curta contráctil dependendo se pertencem à família *Myoviridae*, *Siphoviridae* ou *Podoviridae*, respetivamente [25, 26, 28]. Em conjunto estas três famílias formam a ordem Caudovirales [15, 19, 29]. Os restantes 4% dos fagos estão divididos pelas restantes dez famílias [8, 12, 27].

### 1.1.3 Ciclo de Multiplicação

Para se replicarem, os bacteriófagos infetam células bacterianas e usam a sua maquinaria de replicação para formar novas cópias de si próprios, ou seja, os vírus dependem do seu hospedeiro para a síntese da maioria das macromoléculas, para transcrição, replicação e suporte estrutural [11, 16].

Em termos de ciclo de replicação, os fagos são classificados em duas categorias: os que apresentam um ciclo lítico realizando uma lise rápida que provoca a morte da célula bacteriana, designados por fagos virulentos e os que apresentam um ciclo lisogénico, passando parte do seu ciclo de vida no estado latente e que se designam por fagos temperados [9, 16, 21, 30]. Na Figura 3 está representado o processo de replicação de fagos. Apesar das diferenças nos ciclos de multiplicação algumas fases são comuns: i) ligação e adsorção do virião pelo hospedeiro; ii) penetração do ácido nucleico na bactéria; iii) síntese do ácido nucleico e proteínas usando o metabolismo da célula hospedeira; iv) montagem dos capsómeros e empacotamento do ácido nucleico no novo virião; v) libertação dos viriões maduros [23].

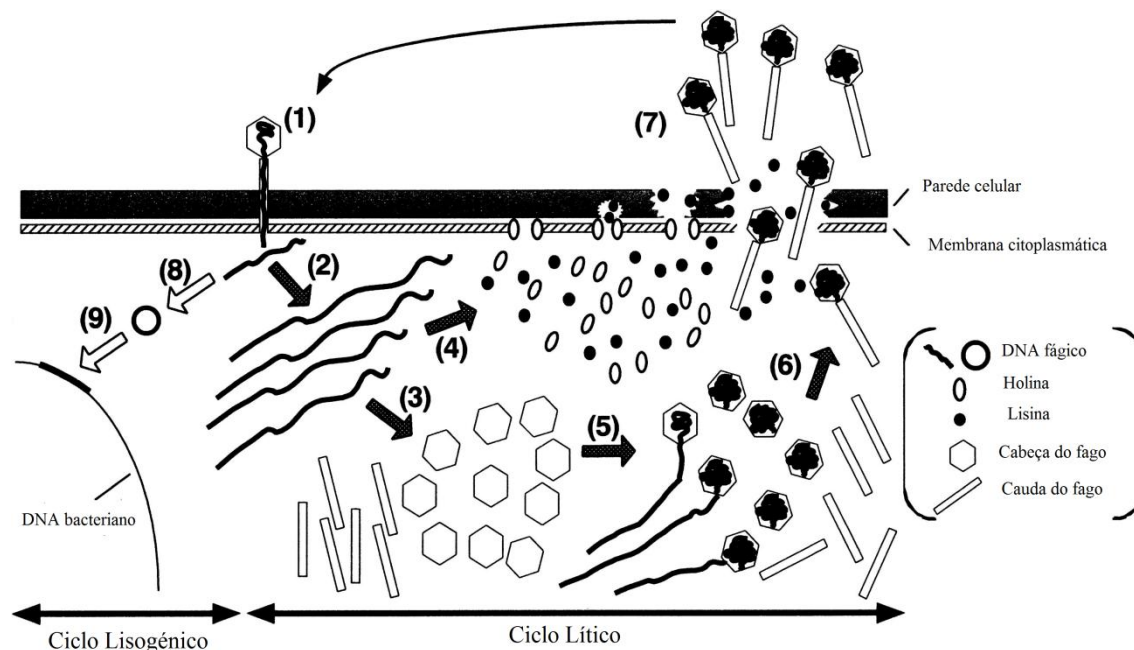
O encontro entre fago e bactéria é um evento aleatório, que ao acontecer promove o reconhecimento e ligação dos dois por recetores específicos à superfície celular [9, 18]. Quando acontece, a ligação é primeiramente reversível passando depois para irreversível, dando-se a transferência do material genético viral para dentro da célula bacteriana que será a sua hospedeira durante o processo de formação de novas partículas virais [18]. O processo de injeção do material genético tem algumas variantes consoante o tipo de fago, mas na sua maioria acontece pela contração da cauda e formação de um buraco na parede da célula [18]. A partir deste evento o fago passa a controlar a maquinaria da célula bacteriana, nomeadamente, da RNA polimerase que começa a transcrever o genoma do fago, formando o mRNA que vai levar à síntese de novos compostos virais que ao organizarem-se formam um virião [18].

Depois de formadas, as novas partículas virais são libertadas. A maioria dos fagos de dsDNA possui enzimas que conseguem degradar o peptidoglicano que constitui a parede celular das bactérias [18, 31]. De entre estas enzimas encontra-se a lisozima que cliva ligações glicosídicas, e as endopeptidases que clivam ligações peptídicas não terminais dos aminoácidos. Estas enzimas líticas conhecidas como endolisinas [9] necessitam da presença de uma outra enzima, a holina que está associada ao colapso do

potencial de membrana e permeabilização da membrana tornando possível que as enzimas líticas atravessem o citoplasma membranar e alcancem o substrato [12, 18, 31-33]. Os fagos que apresentam uma morfologia filamentosa libertam-se da célula hospedeira sem lhe causar danos por exclusão [18, 32, 33].

No caso dos fagos que apresentam ciclo lisogénico, não conseguem entrar em ciclo lítico assim que invadem a célula bacteriana. Em vez disso, quando o seu material genético é introduzido no hospedeiro, ele integra-se no DNA da célula bacteriana podendo permanecer lá por tempo indefinido [9, 13, 18]. Apesar de não se replicar no momento em que entra na bactéria, o material genético não é perdido pois ao ser incorporado no do hospedeiro vai ser replicado pela bactéria que estará a transmitir às células filha a informação genética do bacteriófago, levando à formação de um profago [18, 34]. A presença do profago na bactéria pode ser-lhe benéfica, pois pode protegê-la da infeção por outros fagos [9, 15, 32] e pode ainda conferir-lhe patogenicidade, aumentar a sua virulência ou mesmo introduzir genes que codificam para toxinas [9, 13, 18, 21].

Durante o ciclo lisogénico de um fago, a célula bacteriana pode sofrer vários ciclos de divisão até que espontaneamente o fago entre no ciclo lítico [18, 35]. Condições de stress como a presença de luz UV [13, 21], agentes mutagénicos químicos, altas temperaturas, entre outros fatores podem induzir esta mudança de ciclo, desenvolvendo-se o processo anteriormente descrito [16, 34, 36].



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos bacteriófagos (adaptada de [12]).

Legenda: 1- injeção do material genético do fago na bactéria; 2- replicação do material genético; 3- produção da cabeça e cauda; 4- síntese de holina e lisina; 5- empacotamento do material genético; 6- formação de partículas fágicas; 7- lise da parede celular e liberação de novas partículas virais; 8- circularização do fago; 9- integração do material genético do fago no genoma do hospedeiro.

#### 1.1.4 Bacteriófago T4:

O bacteriófago T4 é virulento para *Escherichia coli* (*E. coli*) [29, 36, 37]), sendo totalmente inofensivo para muitas outras bactérias [35] e apenas uma partícula viral é suficiente para infectar a bactéria hospedeira [14, 28].

Este fago, pertencente à família *Myoviridae* [14, 25, 29], tem 168 903 pares de bases [38] sendo considerado um bacteriófago de grandes dimensões [38].

Pode ser encontrado em diversos tipos de ambiente entre eles no intestino de mamíferos, no solo, esgoto e oceanos [8, 36, 39] e portanto tem a capacidade de se adaptar a diferentes condições [9, 14, 38]. Em termos de pH, o T4 é estável em ambientes que apresentem um pH variável entre 6 e 7,4. Por ser um vírus facilmente encontrado e isolado

[8, 37], este fago está largamente estudado e serve como modelo para vários tipos de vírus [15, 22, 39].

O fago T4 apresenta uma cabeça grande alongada, uma cauda helicoidal envolta por uma bainha e uma placa-base à qual que encontram ligadas 6 fibras [22, 24, 39]. A cabeça do bacteriófago é constituída pela cápside que não possui invólucro lipídico [14, 38]. A cauda é constituída por mais de 20 proteínas diferentes e possui na sua constituição um tubo oco não contráctil e uma bainha contráctil [28, 38] (constituída por 144 cópias da proteína gp18 arranjada em 24 anéis, cada um com seis cópias) que estão diretamente envolvidos na infecção de *E. coli* pelo colifago T4 [14, 24, 25, 40]. Na base da cauda encontra-se uma estrutura designada por placa-base que tem normalmente uma estrutura hexagonal e à qual estão ligadas seis fibras em cada um dos vértices que constitui o hexágono. Durante o processo de ligação à superfície da célula hospedeira e de injeção do DNA do fago na bactéria esta estrutura sofre algumas alterações. Assim, a placa-base que no seu estado de repouso tem uma conformação hexagonal, muda para uma conformação em forma de estrela planar sendo que a primeira é associada à posição da bainha estendida e a segunda à posição da bainha contraída [24, 25, 28]. Quando a bainha contrai o tubo oco rígido que esta envolve passa através da membrana da bactéria, criando uma passagem para o material genético do vírus, desde a cápside até à célula hospedeira [24-26, 28]. A ligação do bacteriófago à célula hospedeira é feita em duas fases e, por conseguinte, dois tipos de recetores [40]. A primeira fase passa pela ligação de três das seis fibras da cauda a uma molécula recetora primária (neste momento a ligação do fago à bactéria ainda é reversível) que desencadeia rearranjos na placa-base, que passa a ter conformação estrelar, levando a uma ligação irreversível a um segundo recetor pelas restantes fibras da cauda [24-26, 40]. Após a entrada do DNA do fago na célula bacteriana, as nucleases do hospedeiro são inibidas de forma a não afetar o genoma do fago. A estratégia de inibição destas enzimas passa por provocar alterações na citosina por hidroximetildesoxicitosina (hmdC) o que elimina locais de reconhecimento das enzimas de restrição [39].

Apesar das constantes alterações e evoluções que a célula bacteriana pode sofrer [41] o fago possui um mecanismo de defesa contra estas alterações. Esse mecanismo de defesa consiste na alternância das fibras da cauda que reconhecem diferentes proteínas na superfície da célula ou reconhecem diferentes recetores, sendo que se um deles sofrer uma alteração o fago não perde a sua capacidade de infetar a bactéria pois possui outros locais

de reconhecimento e ligação [13]. Quando estas alterações na célula bacteriana ocorrem os recetores das fibras do fago também necessitam de sofrer alteração de forma a permitir que o reconhecimento e ligação por parte das mesmas continue a ser possível [13, 18, 36].



## 1.2 Conservação de alimentos

Uma vasta variedade de microrganismos, incluindo alguns patogénicos para os humanos, colonizam e crescem em alimentos comuns. O consumo destes alimentos com determinados microrganismos ou produtos do seu metabolismo pode causar infeções ou envenenamento alimentar [42, 43].

A conservação de alimentos é levada a cabo durante o processamento alimentar numa tentativa de manter a qualidade do material cru e as propriedades físico-químicas enquanto providencia produtos seguros que apresentem um baixo potencial de degradação [44]. Para que isso não ocorra é necessário atrasar ou prevenir o crescimento microbiano [45, 46], permitindo um aumento do tempo de prateleira do alimento e que este seja seguro sob o ponto de vista de consumo [47, 48].

O grau de suscetibilidade dos alimentos à atividade microbiana é determinada pelas suas características físicas e químicas. No que diz respeito a deterioração, os alimentos podem ser divididos em três categorias distintas: (1) alimentos perecíveis; (2) alimentos semi-perecíveis; (3) e alimentos estáveis ou não perecíveis. Para esta classificação contribuem fatores intrínsecos ao alimento, como é o caso da atividade da água [49] e pH e fatores extrínsecos como a temperatura do ambiente onde o alimento é armazenado [42, 48]. A atividade da água é a quantidade de água disponível para uso em processos metabólicos e quanto maior for o seu conteúdo no alimento mais perecível de deterioração este se torna. O controlo da água disponível é um dos principais fatores que contribuem para o não crescimento de microrganismos no alimento [49] e pode ser feita de várias formas, como secagem, desidratação, liofilização e congelamento [42]. Os valores de atividade da água que se situem entre 0,65 e 0,86-0,90 impedem o crescimento da maioria das bactérias que causam a deterioração do alimento, no entanto, o mesmo não acontece com algumas leveduras e bolores que são mais tolerantes a quantidades de água mais baixas (0,8) [45].

As técnicas tradicionais de preservação alimentar passam por aplicação de temperatura [45], salga, acidificação, secagem e preservação química [50], que colocam os microrganismos em ambientes hostis, rompendo a sua homeostasia e impedindo a sua proliferação [44, 45]. No caso da aplicação de temperatura, este processo pode ser efetuado por períodos mais longos a temperaturas não muito elevadas causando a secagem do

alimento. A diminuição da atividade da água impede que os microrganismos se desenvolvam e que as enzimas catalisem reações [51, 52] Pode ainda ser aplicado por períodos de tempo curtos e a temperaturas elevadas, sendo designado como processos de pasteurização. Neste caso, o processo é eficaz por provocar desnaturação enzimática e a morte de microrganismos [53, 54]

Apesar de serem eficazes, as técnicas tradicionais começam a ser substituídas por novas pois os consumidores exigem cada vez mais alimentos processados o mínimo possível ou até mesmo crus no caso dos alimentos de origem marinha [55]. Algumas das técnicas de conservação alimentar estão referidas na Tabela 2. Entre as novas técnicas encontram-se: i) irradiação que passa por submeter os alimentos a radiação ionizante (como raios gama que são ondas eletromagnéticas de elevada frequência [56] ou feixes de elétrons) e que é amplamente aplicada em especiarias não sendo no entanto muito bem aceite pelos consumidores) [47, 57, 58]; ii) campos de impulso elétrico que consiste em aplicar impulsos elétricos em produtos alimentares líquidos que se encontram entre dois eletrodos [45, 50, 57], sendo que estes impulsos são de curta duração (alguns milissegundos) [3, 46] e de alta-voltagem (5-80 kV/cm) [3, 46, 47] levando à rutura das membranas celulares dos microrganismos e, conseqüentemente, à sua destruição [3, 45, 50]; ii) alta pressão.

**Tabela 2:** Métodos de conservação de alimentos (adaptada de [45]).

<b>Objetivo</b>	<b>Fator de preservação</b>	<b>Método de realização</b>
<b>Redução ou inibição do crescimento</b>	Baixa temperatura	Armazenamento a frio ou congelamento
	Baixa atividade da água	Secagem, salga e conservas
	Acidificação	Adição de ácidos; fermentação
	Uso de conservantes	Adição de conservantes: inorgânicos (sulfito, nitrito); orgânicos (propionato, sorbato, benzoato, parabenos); antibióticos (nisina, natamicina)

<b>Inativação de microrganismos</b>	Calor	Pasteurização e esterilização
	Irradiação	Irradiação ionizante
	Pressurização	Aplicação de HPP
	Campos de impulso elétrico	Descargas elétricas de alta voltagem

### 1.2.1 Processamento térmico

Os processamentos térmicos incluem pasteurização, esterilização [46, 59], secagem e evaporação e são práticas comuns na indústria para atestar a segurança microbiana dos alimentos [3]. É também comum a nível industrial calcular-se os valores de D e z para um determinado microrganismo, sendo D o número de minutos necessários a uma temperatura constante para inativar 90% dos microrganismos existentes inicialmente, e z o valor em °C necessários aumentar num processamento para diminuir o valor de D em um fator de 10 [51, 52].

O processamento térmico é eficiente quando aplicado a alimentos húmidos sendo um procedimento largamente utilizado na indústria alimentar para inativar microrganismos [46, 47, 57, 60] e permite um aumento do tempo de prateleira do alimento, assim como a sua segurança microbiológica [45, 47]. No entanto, os processos térmicos causam uma perda das propriedades nutricionais e organoléticas dos alimentos [3, 45, 46], principalmente quando é necessária a destruição de esporos bacterianos que exigem um tratamento a altas temperaturas [47], sendo no entanto, o método mais eficaz para o conseguir [46]. Esta alteração das características deve-se, entre outras razões, à desnaturação das proteínas e destruição de vitaminas [60].

A eficácia dos tratamentos térmicos na inativação de microrganismos passa por afetar constituintes celulares e reações importantes para a sobrevivência celular [57].

Apesar de eficientes, os processos térmicos trazem algumas desvantagens, como a impossibilidade de serem aplicados em produtos frescos havendo assim a necessidade de surgirem novas tecnologias aplicáveis à indústria alimentar. A alta pressão tem um elevado potencial para poder substituir os processos térmicos mantendo os níveis de segurança e qualidade alimentar [61].

### **1.3 Alta pressão Hidrostática**

Hoje em dia, os consumidores exigem cada vez mais alimentos com o mínimo de processamento possível e que mantenham as suas características intrínsecas [42, 50, 57], sem que isso comprometa a sua saúde [44, 47].

Uma das técnicas de processamento não-térmico mais investigadas é a tecnologia de alta pressão hidrostática (HPP) [47, 50] que será discutida de forma aprofundada ao longo deste capítulo.

A alta pressão tem a capacidade de criar alimentos de elevada qualidade com as características dos alimentos frescos, sendo microbiologicamente seguros e com um elevado tempo de prateleira [61]. Esta tecnologia inativa enzimas e microrganismos responsáveis pela degradação dos alimentos e ainda alguns microrganismos patogénicos, mantendo as características sensoriais e as vitaminas intactas [61].

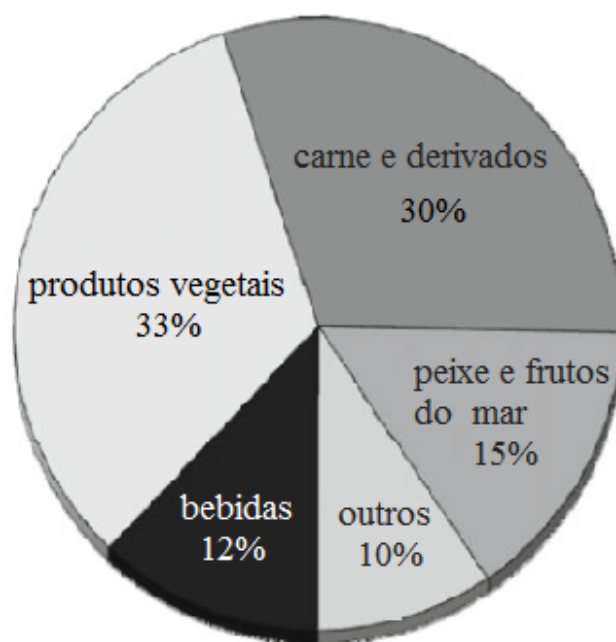
#### **1.3.1 Alta pressão na conservação de alimentos:**

A tecnologia de alta pressão é uma técnica não térmica que tem a capacidade de eliminar com facilidade células vegetativas de microrganismos causadores de doenças [62] e inativar enzimas responsáveis pela degradação alimentar [3]. Esta técnica provoca uma

menor perda das características nutricionais e organoléticas dos alimentos [47, 63, 64] pelo facto de serem usadas pressões entre 100 e 1000 MPa [62]. No caso da inativação enzimática, ocorrem alterações conformacionais nas proteínas constituintes induzindo alterações no local ativo, o que impede a formação do complexo enzima-substrato [43, 64, 65]. Algumas das enzimas envolvidas na degradação de alimentos são: i) peroxidase que induz alterações de sabor durante o armazenamento de vegetais e pode ser inativada em feijões sob pressões de 800/900 MPa durante 10 minutos; ii) lipase envolvida na hidrólise lipídica e cuja inativação varia entre 600 e 1100 MPa dependendo do tipo de alimento; iii) polifenoloxidase responsável pelas reações de acastanhamento enzimático de frutas e vegetais. Estas enzimas provocam alterações de qualidade nos alimentos e apresentam uma grande variabilidade na sua resistência à pressão [43, 65, 66].

Os primeiros alimentos processados por alta pressão foram inicialmente comercializados no Japão tendo-se depois espalhado pelo mundo [62]. Atualmente esta

técnica já é utilizada no processamento de vários tipos de alimentos (Figura 4) como em carnes, sumos de fruta (incluindo em Portugal [65]), salsa e bivalves tanto para conservação como para facilitar a separação da concha, e abacate, podendo ser aplicada tanto em alimentos líquidos como sólidos [50, 62, 67].



**Figura 4:** Aplicação do método de alta pressão em diferentes tipos de alimentos no ano de 2010 (adaptada de [64]).

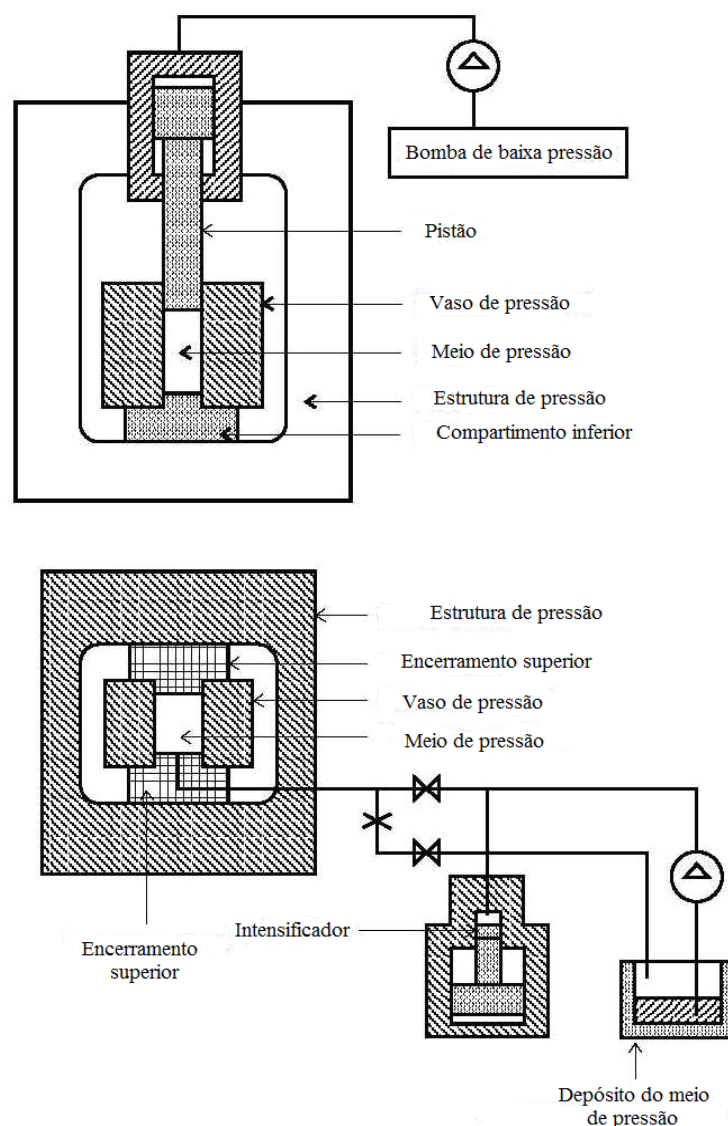
### 1.3.2 Equipamentos e processo:

O primeiro equipamento de alta pressão usado na indústria foi construído no Japão em 1990, estando disponíveis na Europa e nos Estados Unidos da América em 1996 [68].

Os primeiros equipamentos eram verticais o que limitava a sua capacidade de processamento. Atualmente são horizontais permitindo a diminuição da altura e, portanto, que o sistema de instalação e relocação sejam mais viáveis, facilita a manipulação do produto e reduz o risco de trocas entre produtos pressurizados e não pressurizados uma vez que o processo é feito em linha [64]. No entanto, o tipo e forma de equipamento não afeta

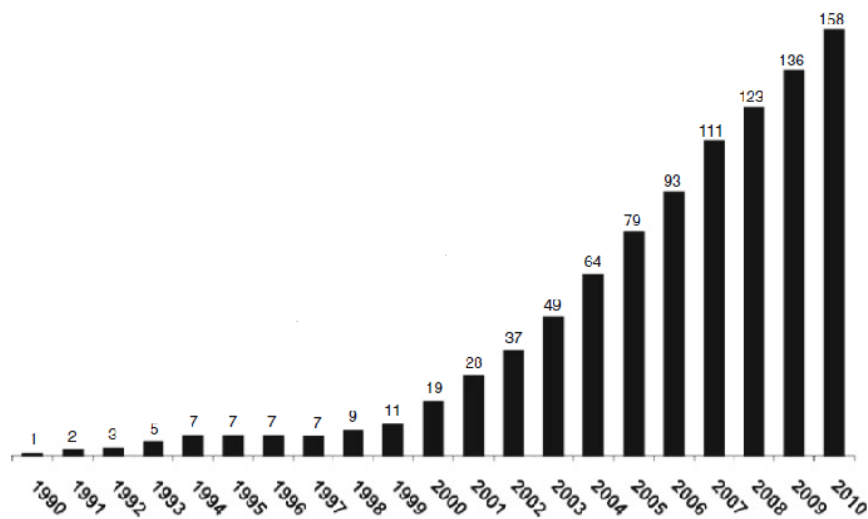
os resultados da inativação de microrganismos e conservação alimentar, o que permite passar da escala laboratorial para a industrial sem que existam diferenças significativas nos resultados obtidos [64, 69].

O sistema de pressurização (esquemáticamente representado na Figura 5) inclui um vaso de pressão, gerador de pressão, fluido de pressurização, dispositivo de controlo de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto [63, 64]. O vaso de pressurização é normalmente um cilindro de aço inoxidável que apresenta uma elevada resistência à pressão. Este vaso contém o fluido de pressurização que pode ser água, óleo mineral ou vegetal, ou uma mistura de ambos e que tem como função transmitir a pressão de igual forma por todo o alimento [62]. Na indústria alimentar é normalmente usada água que permite reduzir os custos do processo e ainda prevenir a contaminação química dos alimentos [62, 70]. Em termos de processamento, a compressão dos produtos pelo equipamento pode ser feita de forma direta ou indireta sendo a segunda a mais comum [66]. No modo de compressão direta o vaso é preenchido com um meio de pressurização que é comprimido por um pistão movido por uma bomba de baixa pressão. Este método causa um grande desgaste do equipamento devido ao atrito exercido nas paredes do vaso para que não ocorram perdas de pressão, levando a um aumento do custo de processamento. O método de compressão indireta é constituído por um ou mais intensificadores de pressão que bombeiam o meio de pressurização do reservatório para o vaso até atingir o nível de pressão desejado [66, 70, 71]. O uso de múltiplos intensificadores de pressão permite reduzir o tempo necessário para o alimento se encontrar sob a pressão desejada e ainda facilita a reparação e manutenção pois estes intensificadores trabalham de forma independente. É ainda possível partilhar um conjunto de intensificadores entre dois ou mais vasos de pressão para reduzir a necessidade de investimento capital, que por si só já é bastante elevado [64].



**Figura 5:** Representação esquemática do equipamento de alta pressão (adaptada de [62]).

Apesar do custo associado à compra e instalação dos equipamentos reduzir a capacidade de pequenas e médias empresas de terem estes equipamentos nas suas instalações industriais, o seu número tem vindo a aumentar como se pode ver na Figura 6. No entanto, ao longo do tempo o investimento inicial pode tornar-se rentável, visto que é menos dispendioso o uso de pressão até 500 MPa do que um tratamento térmico de 100°C [3]. Isto acontece porque após se ter atingido a pressão desejada, não é necessária energia para manter a pressão [63, 71].



**Figura 6:** Evolução do número de equipamentos de alta pressão existentes na indústria alimentar a nível mundial entre 1990 e 2010 [64].

### 1.3.3 Princípios da técnica:

O processamento por pressão assenta em dois princípios: Princípio de Le Chatelier e o Princípio isostático. O princípio de Le Chatelier indica que um sistema em equilíbrio responde a qualquer perturbação com uma alteração que tende a contrariar a perturbação a que foi sujeito inicialmente [65, 72], ou seja qualquer reação ou mudança conformacional acompanhada por uma diminuição de volume é aumentada pela pressão e vice-versa [62, 65].

O princípio isostático implica que uma qualquer pressão é aplicada de forma instantânea e homogênea em toda a amostra não dependendo da sua forma ou tamanho [3, 64].



#### **1.3.4 Inativação de vírus por Alta pressão**

O facto de cada vírus necessitar de uma temperatura e pressão específicas (como pode ser observado na Tabela 1) demonstra que as condições de processamento não podem ser generalizadas mesmo quando se comparam vírus da mesma família [4, 5]. Esta diversidade de resposta ao processamento passa pelo tipo de material genético, presença ou ausência de involucro lipídico, complexidade da estrutura da cápside, etc. No entanto, mesmo vírus da mesma família, que apresentam características morfológicas semelhantes podem ter diferentes resistência à pressão como é o caso de duas estirpes GI.1 e GII.4 do Norovírus Humano que à temperatura ambiente são totalmente inativados, respetivamente a 200 MPa e 400 MPa [67].

Dos vírus transmitidos por alimentos destacam-se o Norovírus humano (HNoV), vírus da Hepatite A (HAV) e Aichi vírus (AiV) [73], todos eles implicados em surtos associados ao consumo de ostras cruas [5, 73-75]. A contaminação de alimentos por estes vírus pode provir do mau manuseamento dos alimentos, do uso de águas não potáveis e ainda de águas contaminadas em culturas de bivalves [76, 77].

Por não serem facilmente eliminados pelo processo depurativo nos bivalves, os vírus requerem outro tipo de tratamento como a alta pressão que pode ser bastante eficaz na sua inativação. O vírus da hepatite A pode ser reduzido em 3 log com um tratamento de 1 minuto a 400 MPa como foi demonstrado por Calci et al. (2005) que contaminou bivalves com HAV e os submeteu a tratamento de pressurização [78].

A inativação dos vírus por esta técnica passa principalmente por alterações conformacionais nas proteínas da cápside que podem ou não ser reversíveis, não afetando porém o material genético quer seja de DNA ou RNA [79, 80]. A irreversibilidade destas alterações conduz à inativação do vírus que perde a sua capacidade infecciosa e portanto não se consegue replicar [2, 70, 79].

**Tabela 3:** Resultados de estudos de inativação de vírus de células animais processados por alta pressão.

Vírus	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
<b>AiV</b>	600	5	20	0	[73, 76]
<b>CAV9</b>	500	5		6,5	
<b>CBV5</b>	600	5		0	
<b>HPeV-1</b>	600	5		4,6	
<b>HAV</b>	400	1	20	2,5	[81]
<b>FCV</b>	300	5	20	5,4	
<b>FCV</b>	350	3	18-20	5	[75]
<b>HAV</b>	400	10	18-20	< 2	
<b>PV</b>	600	5	18-20	0	
<b>FMDV</b>	240	60	T amb	4	[82]
<b>MNV</b>	350	2	4	> 8	[1]
<b>HAV</b>				3,23	
<b>FCV</b>				2,89	
<b>FCV</b>	200	5	5	5,4	[83]
<b>HAV</b>	400	5	5	4,41	
<b>MNV-1</b>	400	5	0	4,1	[84]
<b>MNV-1</b>	400	5	4	5,13	[85]
<b>MNV-1</b>	450	5	20	7	[77]
<b>MNV-1</b>	400	5		7,4	[80]

Por serem difíceis de propagar em laboratório alguns vírus transmitidos por alimentos são estudados com base em modelos, nomeadamente bacteriófagos [4, 74, 86]. Para tal o modelo deve satisfazer as seguintes condições i) ter tamanho e estrutura similares ao vírus alvo; ii) não ser patogénico; iii) ser ligeiramente mais resistente à pressão do que o vírus; iv) ser de fácil manipulação e propagação em laboratório [5, 6]. Os fagos por serem geralmente muito resistentes a fatores ambientais como luz solar e temperatura e a tratamentos físicos e químicos têm sido propostos e testados como modelos de HAV para processos de alta pressão [6, 74, 87]. Black, et al. (2010)

compararam a resistência a vários tratamentos de pressão entre o HAV e o T4 havendo vários comportamentos similares em pressões entre os 250 e 500 MPa [5]. Estas similaridades podem estar relacionadas com o facto de as proteínas da cápside dos dois vírus serem afetadas de forma semelhante pela pressão [5]. No entanto, quando os autores compararam a resistência a pressão dos dois vírus na matriz de ostras estes revelaram ter comportamentos diferentes [5].

**Tabela 4:** Resultados de estudos de inativação de bacteriófagos processados por pressão.

Fago	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
MS2	500	5	20	< 1	[5]
MS2	500	5	20	1,5	[88]
Qβ				2,8	
Qβ	400	5	21	1	[87]
	600	5	21	7	
Qβ	600	10	20	> 6	[74]
Δimm 434	400	1	20	4,9	[6]
Δ cI 857	400	1	20	7,3	
Δ cI 857A	400	1	20	6,9	
T4	400	1	20	3,3	
T4	450	5	21	6-7	[6, 87]
T4	500	5	4	1,5	[88]
P001	450	30	25	3	[89]
P008	600	120	25	5	
phiX174				1,6	

### 1.3.5 Parâmetros que influenciam a inativação de vírus por alta pressão

O processo de inativação de vírus é influenciado por fatores ligados ao processo como é o caso da temperatura, pressão e tempo de pressurização [68, 70] e às condições em que o vírus se encontra no alimento como o valor de pH e a concentração de NaCl da

matriz alimentar [5, 63, 67, 90]. Estes fatores podem influenciar a eficácia do processo aumentando ou diminuindo a barossensibilidade do vírus. A própria matriz do alimento pode ter um efeito protetor do vírus como no caso do Norovírus murino em que se obteve uma maior redução do título viral (5,56 log) quando este se encontrava em suspensão mesmo quando a pressão de tratamento é mais baixa (350 MPa) do que quando este foi tratado em amostras de ostra (tratamento de 400 MPa com redução de 4,0 log) [77].

#### 1.3.5.1 Pressão e tempo de processamento

Mantendo constante todos os outros parâmetros que têm influência sobre a inativação de vírus, quanto maior for a pressão aplicada maior será a inativação alcançada obtendo-se um comportamento linear [77]. Assim, a representação gráfica da redução logarítmica do título do vírus em função da pressão aplicada dá origem a uma reta de declive negativo [70] como relatado num estudo de Kingsley et al. (2004) com o Norovirus murino (MNV) [76].

Para o parâmetro tempo tem sido observado o mesmo tipo de resultados, ou seja, quanto maior é o tempo de exposição à pressão maior será a inativação. No entanto, numa representação gráfica da pressão aplicada em função do tempo de pressurização obtém-se uma curva de redução logarítmica, o que indica que nos primeiros minutos de pressurização a inativação é mais rápida do que em tempos muito longos, tendo tendência a estabilizar e podendo atingir um ponto em que o aumento do tempo de processamento deixa de ter efeito na inativação [62, 77, 90]. Por exemplo, no caso do bacteriófago Q $\beta$  um aumento do tempo de pressurização de 10 para 20 minutos a 500 MPa levou a um aumento de inativação para o dobro, enquanto um aumento do tempo para 30 minutos não teve quase efeito [74]. Outro exemplo é o caso do fago MS2 que é quase totalmente inativado (redução superior a 3 log) nos primeiros 10 minutos de tratamento, havendo uma redução de menos de 1 log entre os 10 e os 60 minutos [6]. No caso do colifago T4 um aumento de 5 para 20 minutos a 350 MPa apenas aumentou a redução em 0,5 log [6]. Este fenómeno parece ser geral para o tratamento por alta pressão pois tem sido observado para outros microrganismos [77] (Tabela 5).

Assim, é muitas vezes considerado mais eficaz o uso de pressões elevadas associada a tempos de pressurização curtos do que o contrário, permitindo também rentabilizar o tempo de processamento na indústria [75].

**Tabela 5:** Resultados de estudos do efeito da pressão e tempo de processamento na inativação de vírus por alta pressão.

Vírus	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
HAV	400	1	20	1,5	[90]
	450			2,5	
	500			4,5	
MNV	325	5	20	0	[77]
	350			1	
	375			3,5	
	400			4,5	
	425			5	
	450			7	
MS2	500	5	21	<1	[6]
	600			3,3	
MNV	300	2	20	1,5	[1]
	450			5,5	
HAV	300	5	T amb	<1	[91]
	400			3,6	
HAdV	300	10		1,3	[92]
	400			6,5	

#### 1.3.5.2 Temperatura

Uma das maiores vantagens do uso da tecnologia de alta pressão na indústria alimentar comparativamente aos processos térmicos é que ela pode ser levada a cabo numa gama de temperatura entre 0°C e 100°C, ou mesmo acima, permitindo que seja realizada à temperatura ambiente [87]. O facto de não ser necessário o uso de temperaturas elevadas permite que não haja alteração do alimento e, consequentemente, perda de constituintes como é o caso de vitaminas e proteínas [2, 70].

Enquanto o aumento da pressão aplicada e do tempo de processamento conduz a um aumento da inativação, no caso da temperatura não existe um padrão de variação tão regular (Tabela 2). A influência deste parâmetro está intimamente relacionada com o tipo de microrganismo que se pretende inativar, podendo ter efeitos antagónicos, no entanto, um desvio da temperatura ideal de crescimento do microrganismo facilita a sua inativação [70]. Assim sendo, tenta-se otimizar o processo de forma a ser possível o uso da temperatura ambiente, mas, em alguns casos, o uso de temperaturas ligeiramente mais elevadas ou mais reduzidas pode ter uma influência positiva permitindo reduzir o tempo de pressurização ou mesmo a pressão aplicada [87].

A vantagem do uso de temperaturas baixas na inativação de vírus parece estar associada ao facto de estas temperaturas promoverem a exposição das cadeias não polares dos aminoácidos à água [72] e por maximizarem a desnaturação proteica sob pressão devido ao aumento da densidade das moléculas de água na gaiola de solvatação [77]. Li et al. (2013) fez um estudo com duas estirpes de Norovirus Humano, usando pressurizações de 300 e 500 MPa dependendo da estirpe e a temperaturas de 1, 4, 10, 21 e 35 °C tendo obtido inativação total à temperatura de 1 °C sem necessitar de recorrer a pressões elevadas. Para obter os mesmos resultados de inativação total dos vírus a temperaturas mais elevadas, foi necessário recorrer ao uso de pressões mais altas [67].

Apesar de ser considerado como um parâmetro controlável, a temperatura sofre algum aumento durante a pressurização devido ao calor adiabático [90], podendo haver uma variação de 3 a 9 °C por cada 100 MPa aplicada [71].

**Tabela 6:** Resultados de estudos da influência da temperatura na inativação de vírus por alta pressão.

Vírus	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
MNV	350	5	5	5,56	[77]
			10	4,77	
			20	1,79	
			30	1,15	
Q $\beta$	450	5	40	4	[87]
			50	5,9	
SP	450	5	40	2,7	
			50	6,3	
MNV	350	2	4	8,1	[1]
			20	4,1	
CAV 9	400	5	4	5,4	[73]
			20	3,4	
			30	2,5	
CBV 5	600	10	4	3,8	
			20	1,2	
			30	1,4	
HPeV	475	5	4	2,5	
			20	4,1	
			30	4,2	
HRV	350	2	4	4,7	[93]
			20	5,7	

#### 1.3.5.3 pH

Os vírus são na sua generalidade muito resistentes a variações de pH [1, 94]. Quando falamos de vírus sujeitos a pressurização, o pH tem influência na sua inativação sendo que pH ácidos parecem ter um efeito protetor no vírus, dificultando a sua inativação [90]. No entanto, este comportamento não é observado em todos os vírus, por exemplo um estudo feito com HAV em ostras demonstrou que este vírus é mais facilmente inativável

em ambiente ácido, pelo que se tem usado durante o tratamento a pH baixos em vez de temperaturas elevadas [90].

Num estudo levado a cabo com o vírus do mosaico do tabaco (TMV), Santos et al. (2004) concluíram que a o uso de pressão provoca um aumento da dissociação das proteínas virais e quando associada a pH alcalino, este fenómeno é intensificado. Valores de pH elevados (9,5 a 10,5) promovem uma diminuição da afinidade das subunidades da cápside umas com as outras, facilitando a inativação [95]. Na mesma direção um outro estudo, desta vez realizado por Li et al. (2013) também foi observado que duas estirpes diferentes de Norovirus Humano eram mais sensíveis à pressão a pH neutro do que a pH 4, no entanto, não foram realizados testes com valores de pH mais elevados [67].

Outros exemplos de estudos realizados com diferentes valores de pH em vírus estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Resultados de estudos da influência do pH na inativação de vírus por alta pressão.

Vírus	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	pH	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
HAV	400	1	5	3	3,8	[90]
				4	2,8	
				5,2	1,9	
				6	2,3	
				7	2,2	
			20	3	5,1	
				4	3,6	
				5,2	3,4	
				6	2,8	
				7	2,4	
			50	3	5,2	
				4	5,4	
				5,2	5,4	
				6	4,5	
				7	4,4	



MNV	350	2	20	4	1	[1]	
				7	3,5		
MNV-1	350	2	21	4	0,1	[94]	
				7	2		
TV	350	2	21	4	0,2		
				7	3,8		
HVR	300	2	4	4	2,7	[93]	
				7	4,5		
HAdV	350	10		4	4	3	[92]
					7,8	4,5	

#### 1.3.5.4 Concentração de NaCl

Os alimentos possuem diferentes quantidade de sal na sua composição, o que afeta a inativação dos vírus por alta pressão. Assim, o estudo de diferentes concentrações de sal na inativação de vírus têm como objetivo perceber se uma maior ou menor quantidade de sal, ajuda ou prejudica na inativação dos vírus [83, 90].

São poucos os estudos feitos sobre a influência da concentração de NaCl na inativação de vírus processados por alta pressão. Os estudos feitos até agora (Tabela 8) mostram que para o HAV existe uma tendência de aumento da resistência à pressão com o aumento da concentração de sal [90], ou seja, o sal tem um efeito protetor na inativação ao vírus [4].

Um outro estudo indica que o MNV tem um comportamento contrário ao apresentado pelo HAV, mostrando uma maior inativação a concentrações mais altas de NaCl [96].

**Tabela 8:** Influência da percentagem de NaCl na inativação de HAV pelo tratamento de alta pressão.

Vírus	Pressão (MPa)	Tempo de pressurização (minutos)	Temperatura (°C)	% NaCl	Redução logarítmica (log UFP/mL)	Referência bibliográfica
HAV	400	1	5	0	1,4	[90]
				0,3	0,5	
				1	1,3	
				3	0,4	
				6	0,4	
			20	0	2,1	
				0,3	1,8	
				1	1,4	
				3	0,4	
				6	0,4	
			50	0	3,8	
				0,3	4,1	
				1	3	
				3	3,3	
				6	0,5	

#### 1.4 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo estudar a inativação do bacteriófago T4 a diferentes pressões e diferentes tempos de tratamento, assim como determinar a influência que o meio envolvente tem sobre a sua inativação, nomeadamente o valor de pH e a concentração de NaCl. O segundo propósito deste estudo foi investigar a cinética de inativação por alta pressão, calculando os valores de D e z associados ao processo de inativação do fago T4.

## **2    Materiais e Métodos**

### **Suspensão do bacteriófago T4**

A suspensão do bacteriófago T4 utilizado neste trabalho foi feita a partir de uma suspensão inicial preparada de uma amostra de água residual tratada secundariamente numa estação de tratamento de águas residuais da Cidade de Aveiro [97]. Para a produção da nova suspensão de fagos, incubou-se 100 µL de *Escherichia coli* (ATCC 13706) como bactéria hospedeira em 30 mL de Trypticase Soy Broth (TSB) durante 4-5 horas a 37 °C sob agitação (120 rpm). Após o período de incubação, foram adicionados 500 µL da suspensão fágica inicial e voltou-se a incubar sob as mesmas condições durante 5 horas. Procedeu-se à centrifugação da cultura (12 000 rpm durante 10 minutos) a fim de eliminar bactérias intactas e restos de células. A suspensão foi adicionada de 50 µL de clorofórmio e armazenada a 4 °C.

### **Quantificação do título fágico**

Para determinar a redução do título fágico provocada pela alta pressão, o seu título foi quantificado antes de depois dos tratamentos por pressurização. Para tal foi usada a técnica da dupla camada de agar [23]. As diluições do bacteriófago foram feitas de forma seriada em Phosphate Buffered Salt (PBS). 100 µL de suspensão do fago e 100 µL de cultura de bactéria fresca foram adicionados a tubos com 4 mL de Tryptone Soy Agar semi-sólido (mole (TSA mole) fundido. O conteúdo foi agitado e espalhado de forma uniforme sobre placas de Petri contendo uma camada de TSA, que foram incubadas a 37 °C durante a noite. O número de placas fágicas formadas foi contado, sendo os resultados expressos em unidades formadores de placa por mililitro (UFP/mL).

### **Estudo do efeito da pressão e tempo de processamento na inativação do bacteriófago T4**

A suspensão de fagos foi diluída de 1:10 em PBS de forma a obter uma concentração de cerca de  $10^9$  UFP mL<sup>-1</sup> e distribuída por eppendorfs de 500 µL. Os eppendorfs foram selados com parafilme, colocados em sacos com etanol resistentes às condições de alta pressão que foram selados a quente. Estes sacos foram colocados em sacos maiores contendo água, foram selados a quente e submetidos a diferentes condições de processamento tal como indicado na Tabela 9.

**Tabela 9:** Condições de processamento usadas no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento na inativação do bacteriófago T4.

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Tempo de processamento (minutos)</b>
<b>150</b>	2,5   5   10
<b>200</b>	1   2,5   5   10   20   30
<b>250</b>	1   2,5   5   20
<b>300</b>	0,25   1   2,5   5   10   20   30   60   105
<b>350</b>	0,5   1,5   2,5   5,5   7,5   12   18   25
<b>400</b>	0,083   0,5   1   2,5   5   7,5   10   15   20   27,5
<b>450</b>	1   2   3   4   5

#### **Estudo do efeito da concentração de NaCl e pH na inativação do fago T4**

Foi adotado o mesmo procedimento usado no estudo do efeito dos parâmetros valor de pressão e tempo de processamento, variando apenas as concentrações de NaCl e os valores de pH do PBS usados na diluição inicial do fago. Assim, os valores de pH foram modificados com recurso a ácido (HCl) e base (NaOH) obtendo-se valores de 3, 5, 7, 9 e 11 e as concentrações finais de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 e 20 % de NaCl foram obtidas com adição de diferentes concentrações de NaCl. As amostras foram sujeitas a um tratamento de pressurização de 300 MPa durante 5 minutos a 25 °C.

#### **Determinação do valor de D para cada uma das pressões testadas**

O valor de D é o tempo necessário a uma dada pressão para reduzir em 90% o número de microrganismos existentes inicialmente.

Os valores estimados de D (tempo de redução decimal) foram calculados através da seguinte expressão:

$$D=2,303/k,$$

em que  $k$  é o declive obtido pela representação gráfica de  $\ln (N/N_0)$  em função do tempo de tratamento, sendo  $N$ = número de microrganismos sobreviventes após tratamento;  $N_0$ = número de microrganismos antes do tratamento.

**NOTA:** Os protocolos de preparação dos meios de cultura utilizados neste trabalho encontram-se em anexo.

# **3 Resultados**

## Influência da pressão e tempo de processamento na inativação do bacteriófago T4

Os resultados do estudo da influência da pressão e tempo de processamento na inativação do fago T4 estão representados na Tabela 10. Os tratamentos por pressão causam uma rápida descida no título viral nos tempos mais curtos, tendo uma descida menos pronunciada em tempos de processamento mais longos. De entre os tratamentos aplicados ao fago, a maior redução logarítmica foi atingida com o tratamento de 27,5 minutos a 400 MPa, tendo uma redução de cerca de 6 log, semelhante à obtida aquando da aplicação de 450 MPa durante 4 minutos.

O processamento a 150 MPa não teve uma influência muito acentuada sob título viral em tratamentos até 10 minutos, havendo uma redução de cerca de 1,3 log quando comparado com o título inicial do stock de T4. Para tratamentos a 200 MPa durante 30 minutos a redução viral é de cerca de 2,5 log. Foram ainda testadas pressões de 250, 300, 350 e 450 MPa com diferentes tempos em que se obteve uma redução máxima de, aproximadamente, 3 log, 4 log, 4 log e 6 log, respetivamente.

O aumento do tempo de tratamento levou sempre, salvo raras exceções, a um aumento da inativação do fago, o mesmo acontecendo quando se aumentou a pressão a que o fago foi sujeito.

**Tabela 10:** Influência da pressão e tempo de processamento na inativação do bacteriófago T4. O tratamento foi efetuado a 25 °C.

Titulo inicial	Pressão (MPa)	Tempo de tratamento (minutos)	Log UFP/mL (média ± desvio padrão)
8,77 ± 0,18	150	2,5	7,76 ± 0,07
		5	7,65 ± 0,08
		10	7,49 ± 0,05
	200	1	7,51 ± 0,10
		2,5	7,23 ± 0,10



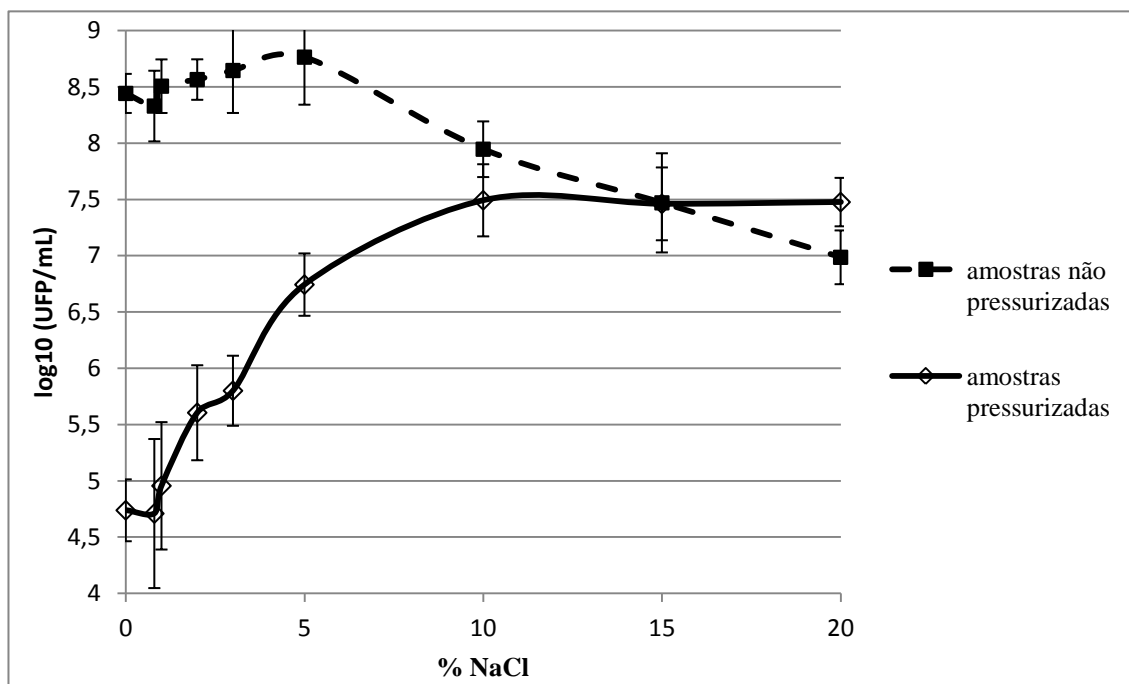
		5	$6,50 \pm 0,18$
		10	$6,42 \pm 0,14$
		20	$6,34 \pm 0,03$
		30	$6,20 \pm 0,02$
	250	1	$7,72 \pm 0,09$
		2,5	$6,73 \pm 0,08$
		5	$6,87 \pm 0,23$
		20	$6,07 \pm 0,24$
	300	0,25	$6,76 \pm 0,10$
		1	$6,86 \pm 0,20$
		2,5	$6,77 \pm 0,09$
		5	$5,95 \pm 0,21$
		10	$5,59 \pm 0,12$
		20	$5,44 \pm 0,05$
		30	$4,66 \pm 0,09$
		60	$4,57 \pm 0,28$
		105	$3,56 \pm 0,22$
	350	0,5	$6,04 \pm 0,07$
		1,5	$6,33 \pm 0,26$
		2,5	$5,59 \pm 0,30$
		5,5	$4,71 \pm 0,26$
		7,5	$4,82 \pm 0,30$
		12	$4,54 \pm 0,16$
		18	$3,89 \pm 0,09$
		25	$3,79 \pm 0,09$
	400	0,083	$6,39 \pm 0,10$
		0,5	$6,15 \pm 0,06$
		1	$5,35 \pm 0,26$
		2,5	$4,82 \pm 0,12$
		5	$4,00 \pm 0,23$
		7,5	$3,50 \pm 0,08$
		10	$3,31 \pm 0,07$
		15	$2,72 \pm 0,08$

		20	$2,64 \pm 0,25$
		27,5	$2,45 \pm 0,08$
	450	1	$4,07 \pm 0,08$
		2	$3,63 \pm 0,12$
		3	$2,97 \pm 0,11$
		4	$2,88 \pm 0,07$

### **Influência da percentagem de NaCl na inativação do bacteriófago T4**

A influência da percentagem de NaCl no título viral está representada na Figura 7. Nas amostras não pressurizadas, o aumento da concentração de sal no PBS em que o fago foi suspenso tem um efeito negativo na viabilidade do fago. Assim, o título fágico foi mais baixo (cerca de 6,9 log) quando o meio de suspensão tem uma concentração de 20% de NaCl do que quando o meio não possui este soluto (cerca de 8,4 log). As diferenças na concentração do bacteriófago são mais notórias com concentrações de NaCl acima de 5%, havendo uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do título viral acima deste valor.

Em relação às amostras pressurizadas, o NaCl presente no meio de suspensão confere ao fago um efeito baroprotetor. Quando aplicado um tratamento de 300 MPa durante 5 minutos, foram obtidas reduções do título viral superiores nas amostras com menor percentagem de NaCl. Apenas nas 3 concentrações de NaCl mais baixas (0%, 0,8% e 1%) não se observou diferença significativa na inativação, tendo sido observado um efeito protetor do vírus nas amostras com NaCl acima de 1%.



**Figura 7:** Representação gráfica da influência da percentagem de NaCl (0; 0,8; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20%) na inativação do bacteriófago T4 por alta pressão. O fago foi suspenso em PBS com diferentes concentrações de NaCl e as amostras foram tratadas a 300 MPa durante 5 minutos a 25 °C. Os dados apresentados no gráfico são a média de três ensaios independentes com as respectivas barras de erro.

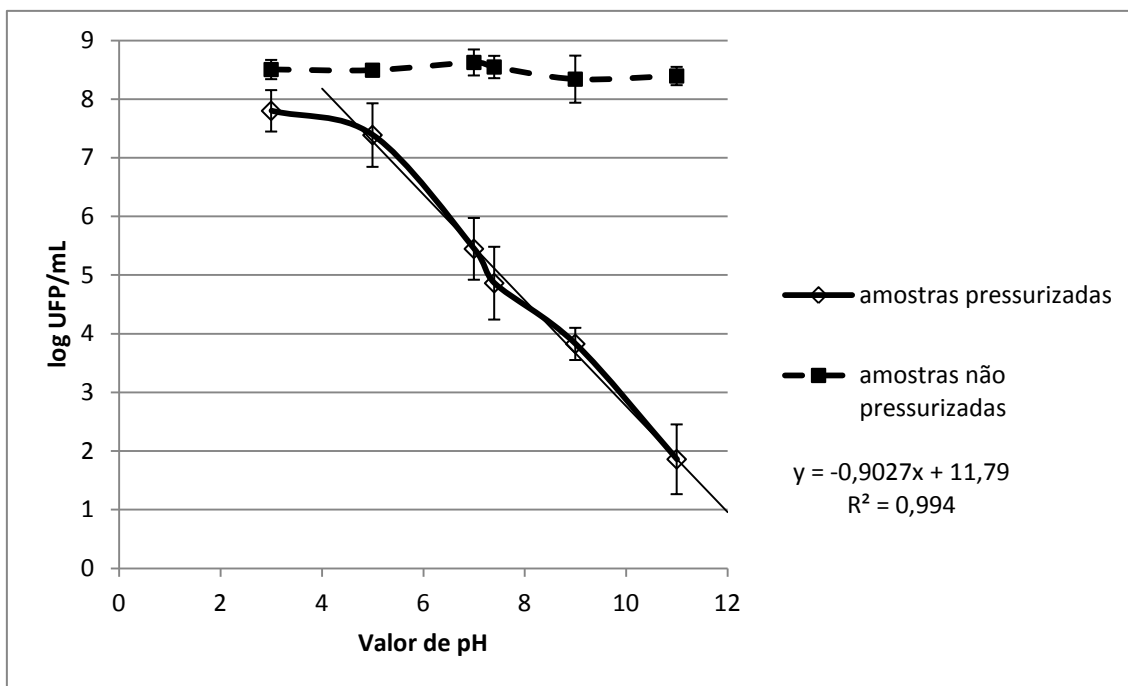
### Influência do valor de pH na inativação do bacteriófago T4

Para se estudar a influência do pH na inativação do fago T4 foram testados valores de pH entre 3 e 11, em amostras não pressurizadas e em amostras sujeitas a um tratamento de pressurização de 300 MPa durante 5 minutos a 25 °C. Os resultados obtidos estão representados graficamente na Figura 8.

Nas amostras que não foram sujeitas a pressurização, as diferenças no valor de pH do meio de suspensão não levaram a grandes alterações no título viral havendo apenas diferença nos valores de pH 7 e 7,4 em que a concentração do vírus foi de 8,62 log e 8,54 log, respectivamente, valores ligeiramente superiores ( $p > 0,05$ ) aos restantes que variaram entre 8,34 log e 8,50 log para pH 9 e 3, respectivamente.

Nas amostras sujeitas a pressurização, o valor de pH afetou o efeito da pressão sobre o fago. Para valores de pH básico houve redução do título viral em cerca de 7 log,

enquanto para pH 3 a redução foi de apenas 1 log. O aumento do valor de pH da suspensão fágica afetou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o efeito da pressão na inativação do fago.



**Figura 8:** Representação gráfica da influência do valor de pH (3, 5, 7, 9, 11) na inativação do bacteriófago T4 por alta pressão. O fago foi suspenso em PBS com diferentes valores de pH e as amostras foram tratadas a 300 MPa durante 5 minutos a 25 °C. Os dados apresentados no gráfico são a média de três ensaios independentes com as respectivas barras de erro.

### Valores de D e z

Para cada uma das pressões testadas foram determinados dois valores da constante cinética ( $k$ ) uma vez que a representação gráfica do título viral em função do tempo de tratamento é uma curva logarítmica bifásica. Os gráficos que permitiram a obtenção dos valores de  $k$  estão representados no Anexo I. Cada uma das curvas logarítmicas pode ser dividida em duas fases com cinética de primeira ordem, possibilitando a determinação de dois valores de  $k$  ( $k_1$  e  $k_2$ ) para cada uma das pressões, e consequentemente dois valores de D. Os valores de  $k$  foram calculados com base na fórmula seguinte:

$\ln(N/N_0)=-kt$ , em que  $N_0$  e  $N$  correspondem aos valores do número de partículas virais por mililitro (UFP/mL) antes e depois do tratamento de pressurização, respetivamente;  $k$  é a constante cinética e  $t$  é o tempo de tratamento.  $D$  foi calculado através da seguinte fórmula:  $D=2,303/k$ .

Os valores de  $k$  e  $D$  estão representados na Tabela 11. Comparando os valores de  $k_1$  e  $k_2$  de cada uma das pressões verifica-se que o valor de  $k_1$  é sempre superior ao valor de  $k_2$ , dando origem a valores de  $D$  superiores na segunda parte das curvas, comparativamente à primeira parte das mesmas. Os valores de  $D$  foram de 2,65 minutos e 28,05 minutos para a pressão de 150 MPa, 4,00 minutos e 77,02 minutos para 200 MPa, 1,18 minutos e 22,23 minutos para 250 MPa, 6,65 minutos e 50,84 minutos para 300 MPa, 0,61 minutos e 17,67 minutos para 350 MPa, 2,21 minutos e 9,49 minutos para 400 MPa e 0,21 minutos e 2,37 minutos para 450 MPa.

**Tabela 11:** Valores do coeficiente de reação ( $k$ ) e valores de  $D$  calculados para cada uma das pressões testadas.

Pressão (MPa)	k		D
150	1	0,87*	2,65
	2	0,082	28,05
200	1	0,58	4,00
	2	0,029	77,02
250	1	1,95	1,18
	2	0,10*	22,23
300	1	0,35	6,65
	2	0,045	50,84
350	1	3,75*	0,61
	2	0,13	17,67
400	1	1,04	2,21
	2	0,24	9,49
450	1	11,05*	0,21
	2	0,97	2,37

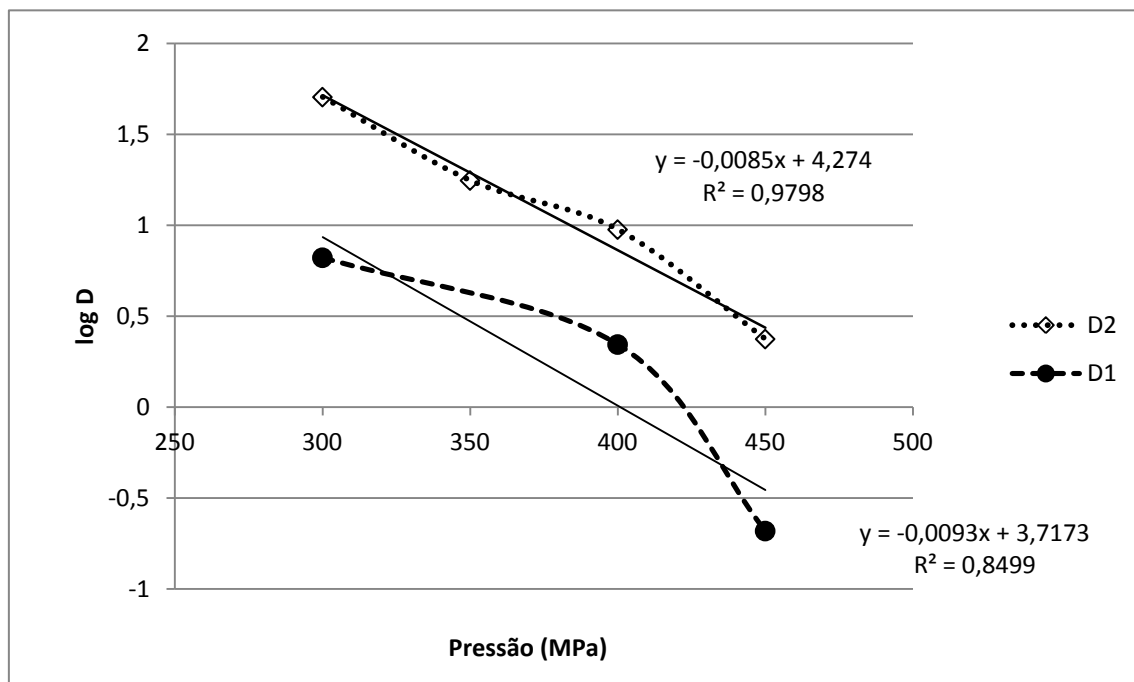
\*valores estimativos determinados através de uma reta de apenas 2 pontos, dado a inativação se verificar ser muito rápida para permitir ter mais pontos experimentais.

Foi ainda determinado o valor de  $z$  correspondente a  $D_1$  e  $D_2$ , sendo o valor de  $D_1$  apenas uma estimativa.  $z$  é o valor de pressão em megapascal que é necessário aumentar de forma a reduzir  $D$  de um ciclo logarítmico. O valor para o fator  $z$  foi obtido calculando o simétrico do inverso do declive obtido pela fórmula:

$$\log(D) = \log(D)_{\text{ref}} + (-T/z).$$

As retas estão representadas na Figura 9.

Os valores de  $z$  obtidos foram 107,53 MPa para a primeira fase das curvas e 117,65 MPa para a segunda fase.



**Figura 9:** Representação gráfica dos valores de  $\log D_1$  e  $\log D_2$  em função da pressão a 25 °C.

## **4 Discussão**

## **Influência da pressão e tempo de processamento na inativação fágica**

Os resultados deste estudo mostram que o aumento da pressão leva a um aumento da inativação fágica e que o mesmo se observa quando se aumenta o tempo de tratamento. De um modo geral quanto maior o tempo de pressurização e mais elevada a pressão aplicada, maior a inativação viral [1]. Kovac, *et al* sugere que pressões baixas afetam apenas as partículas virais mais suscetíveis, sendo que um aumento da pressão e/ ou do tempo de tratamento acaba por afetar também as mais resistentes, acontecendo no entanto a diferentes velocidades [92].

Nos vírus, os níveis de pressão tem efeitos mais dramáticos na sua inativação do que os tempos de tratamento [98], como é possível verificar ao compararmos os resultados das pressurizações a 400 e 450 MPa, em que, para se obterem níveis de redução viral semelhantes (6 log), sendo que no primeiro caso foi necessário um tratamento de 27,5 minutos enquanto para uma pressão apenas 50 MPa superior foi apenas necessária uma aplicação de pressão de 4 minutos. Este facto é ainda mais evidente se compararmos estes resultados com os obtidos a 350 MPa durante 105 minutos em que apenas foi conseguida uma redução de cerca de 5 log. Deste modo, quando se pretende uma determinada redução logarítmica do vírus, é possível optar por um aumento do tempo de tratamento ou por um aumento da pressão, tal como foi discutido por Kovac, *et al* em que um aumento de apenas 50 MPa permitiu reduzir o tempo de tratamento dez vezes obtendo, aproximadamente a mesma redução logarítmica [92].

Os resultados deste estudo foram, em alguns pontos, similares aos obtidos num estudo anterior com o T4 em que um tratamento de 450 MPa durante 5 minutos (a 21 °C) provocou uma redução do título fágico de cerca de 6-7 log [6] e no caso deste estudo um tratamento com a mesma pressão durante 4 minutos (não foi testado o tratamento de 5 minutos) provocou uma redução de, aproximadamente 6 log. Quando os autores aumentaram o tempo de pressurização de 5 para 20 minutos a 350 MPa obtiveram um aumento de inativação de apenas 0,5 log [6], enquanto no caso deste trabalho um aumento do tempo de processamento à mesma pressão de 5,5 para 25 minutos levou a um aumento de apenas 1 log na inativação do título viral. Deste modo, é possível afirmar que, em termos de influência do tempo de tratamento e pressão aplicada, os resultados deste trabalho estão de acordo com o descrito na literatura.



O estudo da influência da pressão e tempo de tratamento num determinado vírus pode ser benéfico para a aplicação desta técnica na indústria alimentar, de modo a que seja possível a otimização do processamento, permitindo a manutenção da segurança alimentar [98].

### **Mecanismo de inativação viral:**

A inativação viral por pressão é conseguida através da interrupção das funções celulares responsáveis pela reprodução e sobrevivência, afetando principalmente a cápside viral, como destabilização do envelope viral ou estrutura da cápside, dos recetores de ligação ao hospedeiro, e talvez degradação de algumas proteínas virais a pressões muito elevadas [99]. Esta técnica não afeta ligações covalentes (ligações de baixa compressibilidade) não causando danos nas estruturas primária e secundária das proteínas, pelo que a inativação de vírus é provocada por alterações na estabilidade das proteínas que constituem a cápside, ou seja, por alteração das estruturas terciária e quaternária que se mantêm por ligações iónicas e interações hidrofóbicas e hidrostáticas [2, 70, 100]. Uma das estruturas que pode ser afeta por alta pressão, são então os protómeros que constituem a cápside uma vez que são complexos proteicos cuja junção é feita por ligações não covalentes [22]. Lou, *et al* estudou por SDS-PAGE a influência da pressão sobre as proteínas da cápside viral do MNV-1 não obtendo diferenças entre as amostras pressurizadas e não pressurizadas, o que permite concluir que não há degradação das proteínas [1]. A destabilização da cápside ou alteração das glicoproteínas do invólucro lipídico, quando este está presente, levam a uma perda de capacidade do vírus reconhecer e se ligar aos recetores específicos encontrados à superfície da célula hospedeira, impedindo assim que o vírus se multiplique. A desestabilização da cápside provoca a dissociação das proteínas que a constituem [79, 100].

Lou, *et al*, estudaram também a forma e tamanho das partículas virais por microscopia eletrónica verificando a presença de irregularidades no tamanho e forma dessas mesmas partículas após o tratamento por alta pressão. As partículas virais sujeitas ao tratamento por alta pressão apresentavam-se mais pequenas, com irregularidades na sua superfície e foram ainda detetadas algumas cápsides virais vazias (sem genoma no seu interior), o que indica que a estrutura do virion e da cápside foram gradualmente

degradados com o aumento da pressão [1]. Apesar da eficiência da técnica de alta pressão na inativação viral, esta não provoca degradação do material genético do vírus, seja ele de RNA ou DNA [1, 92].

### **Influência da percentagem de NaCl na inativação do bacteriófago T4**

Os resultados do estudo da influência do NaCl na inativação do T4, mostram que mesmo as amostras que não foram pressurizadas sofreram uma descida significativa no título viral para concentrações de NaCl acima de 5%. Num estudo realizado por Kingsley, et al com o HAV este fenómeno não foi observado, não se detetando diferenças na concentração viral das amostras não pressurizadas independentemente da concentração salina [90]. No entanto, neste estudo as concentrações de NaCl utilizadas pelos autores (0% a 6%) foram bastante mais baixas do que as usadas neste trabalho (até 20%). Alguns autores defendem que, de uma forma geral, os fagos em meios com concentrações de NaCl superiores às da água do mar (cerca de 3%) sofrem uma perda maior de atividade [101]. A rápida mudança de altas concentrações para baixas concentrações de NaCl (que ocorre aquando da preparação das diluições para a sementeira das amostras) causa uma rápida mudança na pressão osmótica e o fago pode perder o seu DNA [101], o que pode justificar o título mais baixo do fago T4 quando em concentrações mais elevadas de NaCl no nosso estudo.

Os dados obtidos nas amostras que sofreram pressurização, mostram que a presença de NaCl no meio de suspensão do fago tem um efeito protetor sobre este, permitindo que o vírus apresente uma maior taxa de sobrevivência quando exposto à pressão. Na mesma linha de resultados está o estudo referido anteriormente com o vírus da Hepatite A em que se observou uma maior inativação viral quando o vírus foi suspenso num meio com uma concentração salina inferior [90]. Um outro estudo com o fago T4 em que se comparou os resultados de inativação viral obtidos quando o fago estava suspenso em PBS de NaCl com concentração normal de NaCl (0,93%) e numa solução de água do mar artificial (2,32%), foi possível observar que quando o fago se encontrava na solução com maior concentração salina sofreu uma redução de cerca de 4,5 log enquanto em PBS a redução foi de cerca de 6 log num tratamento efetuado a 400 MPa durante 5 minutos [5], sendo que no caso do T4

estudado neste trabalho a redução do título fágico para estas concentrações de NaCl foi de cerca de 4 log.

Este efeito protetor do fago contra a alta pressão pelo sal não está ainda bem compreendido mas já foram propostas algumas teorias para o explicar: i) poderá estar relacionado com o facto de o NaCl interagir preferencialmente com as conformações nativas hidrofílicas das proteínas virais; ii) por alterar as características da gaiola de solvatação aquosa em volta das proteínas da cápside; iii) devido à estabilização dos volumes vazios por deslocamento das moléculas de água ou alterando a densidade e compressibilidade sob pressão [90].

Existem ainda poucos estudos sobre o efeito do sal na inativação viral, mas este é um parâmetro de elevada importância pois a salinidade dos alimentos pode conferir um ambiente protetor ao vírus, uma vez que o sal parece atuar como um estabilizador da cápside viral [4, 85]. É, portanto importante fazer mais ensaios para avaliar o efeito do sal na inativação viral por HPP, usando outros vírus de DNA e também vírus de RNA.

#### **Influência do valor de pH na inativação do bacteriófago T4**

Os resultados deste trabalho mostram que o fago T4 é bastante estável a diferenças no valor de pH em amostras não pressurizadas. Estes dados estão de acordo com um estudo realizado por Kingsley, *et al* que obteve o mesmo comportamento no caso do vírus da hepatite A [90]. Também Kerby, *et al* testaram a estabilidade do fago T7 em tampões com valores de pH entre 3 e 11, durante 1 a 2 semanas, e concluíram que o fago é mais estável a pH 7, e que a pH 3 perde totalmente a sua atividade em apenas uma hora. No entanto, a pH 9, mesmo após 2 semanas o fago ainda conserva cerca de 30% da sua atividade que foi, contudo, totalmente perdida quando o pH subiu acima de 10 [102]. Um outro estudo, realizado por Jonczyk, *et al* demonstrou que o fago T4 é muito estável a pH entre 6-7,4, perdendo cerca de metade da sua atividade a pH acima de 9,2 e abaixo de 4 [101]. Apesar de não ser possível comparar diretamente os dados destes estudos com os deste trabalho por terem tempos de incubação mais longos, é possível observar que, na generalidade, os fagos possuem uma elevada estabilidade a diferentes valores de pH.

Quando analisamos os dados das amostras que foram sujeitas a pressurização (300 MPa durante 5 minutos), é possível observar que o aumento do valor de pH deixa o vírus

mais suscetível à inativação por alta pressão. Apesar de estes resultados não serem iguais para todos os vírus [90], existem vários estudos efetuados com outros vírus em que, de forma semelhante, o aumento do valor de pH facilita a inativação viral. É exemplo disso, o estudo realizado por Lou, *et al* que ao testar a inativação por alta pressão do MNV-1 sob diferentes condições de pH (4 e 7) obteve uma maior redução do título viral a pH 7 (cerca de 4 log) em comparação com os resultados a pH 4 (cerca de 1 log) [1]. Os mesmos autores obtiveram sempre uma maior inativação a valores de pH superiores, quer quando o fago se encontrava em suspensão ou numa matriz de puré de morango [1]. Outros autores testaram também a influência dos valores de pH ácido (pH 4) e neutro em outros vírus, nomeadamente o rotavírus humano e o adenovírus humano, obtendo sempre uma maior taxa de inativação quando os valores de pH eram mais elevados [92, 93].

Apesar de o mecanismo por detrás da influência do valor de pH na inativação viral não estar esclarecido são propostas algumas hipóteses: i) no caso dos vírus com invólucro, sabe-se que a alta pressão pode levar a alterações na conformação das glicoproteínas de superfície levando à perda de capacidade de reconhecimento e ligação à célula hospedeira por parte do vírus [90]; ii) no caso dos vírus sem invólucro o pH afeta a estabilidade da cápside contribuindo para a inativação induzida pela pressão, sendo que esta perda de estabilidade é devida ao fato de pH alcalino facilitar a dissociação das subunidades proteicas que constituem a cápside por diminuir a afinidade entre as mesmas [95].

### **Valores de D e z**

Os valores de D calculados com base nos dados experimentais do estudo do efeito da pressão e tempo de pressurização sobre o fago T4 apresentam características semelhantes entre pressões. Em cada uma das pressões, o valor de D para a primeira parte da curva é sempre menor do que para a segunda. Estes resultados mostram que quando o fago é pressurizado existe uma diminuição do título viral mais acentuada nos primeiros minutos de tratamento do que em tempos de tratamento mais longos. O valor de D deveria diminuir quando se aumenta a pressão de tratamento aplicada, no entanto, esta diminuição não se verifica para todas as pressões neste estudo. Este fenómeno era esperado pois,

pressões mais elevadas requerem, normalmente tempos de processamento mais curtos para obter a mesma redução logarítmica.

Que seja do nosso conhecimento, existe apenas um caso de estudo de inativação de fagos por alta pressão em que foram calculados os valores de D. Avsaroglu, *et al* conduziram um estudo com quatro fagos de DNA de *Lactococcus* e obtiveram valores de D entre 10,3 minutos e 13,8 minutos para pressões de 300 MPa e entre 3,8 e 5,0 para pressões de 350 MPa [103], valores bastante diferentes dos obtidos neste trabalho que variam de 6,65 minutos para D<sub>1</sub> e 50,84 minutos para D<sub>2</sub> para 300 MPa e 0,61 minutos para D<sub>1</sub> e 17,67 minutos para D<sub>2</sub> para 350 MPa. Esta diferença nos valores de D pode dever-se ao fato de os autores apenas apresentarem um valor de D para cada uma das pressões aplicadas a cada fago, enquanto no presente trabalho o comportamento da curva de inativação do T4 permitiu fazer o cálculo de dois valores de D. Estes resultados comprovam mais uma vez que a inativação de vírus por alta pressão também é dependente do próprio vírus e do meio de suspensão usado que no caso do estudo de Avsaroglu, *et al*, foi M17 e neste trabalho foi PBS mesmo que este possua o mesmo tipo de material genético e que os tratamentos tenham sido efetuados à mesma temperatura (25°C).

Existem, no entanto dados para bactérias, como é o caso dos publicados por Erkmen, *et al* que estudou estes parâmetros para *E. coli*. Os autores obtiveram valores de D de 6,10, 3,94, 2,07, 1,35 e 1,04 minutos para pressões de 300, 400, 500, 600 e 700 MPa, respetivamente [104]. Embora não seja possível fazer uma comparação direta, visto que os valores de D estão intimamente relacionados com o tipo de microrganismo, os dados do estudo referido e do estudo realizado neste trabalho com o T4 apresentam algumas similaridades nos valores de D para as pressões de 300 MPa e 400 MPa, que neste trabalho são de 6,65 minutos e 2,21 minutos. Neste caso apenas foram comparados os valores de D obtidos para a primeira parte das curvas (valores de D correspondentes a k<sub>1</sub>), visto que, no caso das bactérias a redução da concentração apresenta um comportamento de cinética de primeira ordem, enquanto no caso do T4 e, tal como alguns autores observaram, a curva de inativação acontece em duas fases, uma primeira fração com uma inativação rápida da população, enquanto a segunda fração parece ser bastante mais lenta, aparecendo como uma cauda na representação gráfica [104, 105].

Num estudo com *E. coli* NCTC 8164 os autores obtiveram um valor de D para cada uma das pressões testadas. Foram obtidos valores de D de 22,9, 6,4, 3,7 e 1,2 minutos para

as pressões de 250, 300, 400 e 450 MPa, respetivamente [106]. Estes dados apresentam algumas semelhanças com os obtidos neste estudo, nomeadamente para o valor de  $D_2$  com 250 MPa,  $D_1$  para 300, 400 e 450 MPa. Pandey, *et al* realizaram outro estudo com *E. coli* ATCC 29055 obtendo valores de D de 32,50, 15,89, 9,37 e 5,96 minutos para 250 MPa, 300, 350 e 400 MPa, respetivamente [107].

Num estudo levado a cabo por Erkmen, *et al* com *Salmonella typhimurium*, os autores obtiveram o mesmo padrão de resultados obtido neste estudo pois também foi necessário calcular dois valores de D para cada uma das pressões testadas. Assim, os resultados obtidos pelos autores encontram-se na Tabela 12 [108].

**Tabela 12:** Valores de  $D_1$  e  $D_2$  obtidos para *Salmonella typhimurium* a várias pressões [108].

Pressão (MPa)	$D_1$ (minutos)	$D_2$ (minutos)
250	5,12	16,45
300	2,59	9,60
350	3,29	6,22
400	3,20	5,76

O cálculo do valor de D a partir da curva de sobrevivência pode ser usado para comparar a resistência de microrganismos em comparação com a eficiência dos tratamentos por pressão [105, 109], uma vez que o valor de D é o tempo necessário em minutos para reduzir uma população de microrganismos para 10% a uma pressão descrita [109]. A importância da determinação dos valores de D e z para os vírus passa pelo facto de na indústria alimentar os valores de D e z serem as constantes cinéticas mais usadas [109]. Assim sendo, os valores de z também foram calculados neste estudo, tendo-se obtido um valor de z de 107,53 MPa na primeira fase, valor este que foi considerado apenas como indicativo, visto os tempos de pressurização serem muitos curtos dificultou a obtenção de mais dados experimentais, e de 117,65 MPa para a segunda fase. Como na segunda fase da curva, a inativação acontece de forma mais lenta era expectável que os valores de D e z fossem mais elevados do que na primeira fase, tal como foi observado. O valor de z corresponde ao valor da pressão (MPa) que é necessária aumentar para obter a redução de um ciclo de D.

Não existem valores de  $z$  calculados para vírus na literatura, no entanto existem alguns para bactérias. Klotz, *et al* obtiveram um valor de  $z$  para *E. coli* NCTC 8164 de 172 MPa [106] e Pandey, *et al* obtiveram ainda um valor de  $z$  de 205 MPa para *E. coli* ATCC 29055 [107], valores não muito dispares dos obtidos neste trabalho. Os valores de temperatura usados nestes estudos foram 25 °C e de 21 °C para a primeira e segunda *E. coli*, respetivamente, no entanto a primeira bactéria estava suspensa em PBS e a segunda em leite cru o que pode justificar o facto de a segunda ter o valor de  $D$  mais elevado visto a matriz alimentar dificultar a inativação por alta pressão.

Para *Listeria monocytogenes* obtiveram-se valores de  $z$  de 480, 506 e 576 MPa, no entanto, estes valores foram obtidos num estudo em que a bactéria se encontrava em leite, sumo de pêssago e sumo de laranja respetivamente [109], sendo expectável que os valores de  $z$  fossem mais elevados visto que a inativação numa matriz alimentar é, normalmente mais difícil e exige pressões mais elevadas do que em PBS.

Para aumentar a segurança alimentar e assegurar a estabilidade microbiana dos alimentos processados por HPP, o tempo de processamento deve garantir uma redução satisfatória na contagem de microrganismos inicial, assim a análise cinética e a dependência da pressão na taxa de inativação é muito importante [104, 105]

## **5 Conclusões**



O bacteriófago T4, tal como outros vírus é suscetível à inativação por alta pressão. A sua inativação é, no entanto, dependente de fatores associados ao processamento, como é o caso da pressão que, ao ser aumentada, leva a um aumento da inativação viral, bem como do tempo de processamento que, ao aumentar, leva a uma redução do título fágico, apesar de ter efeitos diferentes ao longo do tempo. O título viral diminui mais rapidamente nos primeiros minutos de pressurização, não se notando efeitos significativos no aumento da inativação para tempos longos. Fatores externos, como o valor de pH e concentração de NaCl, no meio de suspensão do fago também afetam a eficácia da inativação viral, sendo a inativação mais eficaz a valores de pH mais elevados (reduções de cerca de 7 log a pH 11) do que a valores de pH baixos (reduções cerca de 1 log a pH 3) quando se aplica um tratamento de 300 MPa durante 5 minutos. Nas mesmas condições de tratamento, o aumento da concentração de NaCl do meio de suspensão protege o vírus durante o tratamento por pressão, (inativação de 1,5 e 4 log, respetivamente, à concentração de 20 e de 0% de NaCl).

É possível calcular o valor de D e z para a inativação fágica por alta pressão, sendo que, pela forma logarítmica da curva de inativação são obtidos dois valores de D para cada uma das pressões testadas. No caso do valor de z é difícil calcular quando se aplicam tempos de pressurização muito curtos, devido à dificuldade em se obterem mais dados experimentais.

São ainda necessários mais estudos nesta área para que seja possível o cálculo e aplicação dos valores de D e z na indústria alimentar. É também ainda necessário que se proceda ao estudo da inativação viral em matrizes alimentares reais, visto que estas também influenciam a inativação.

## **6 Bibliografia**

1. Lou F, Neetoo H, Chen H, Li J. Inactivation of a Human Norovirus Surrogate by High-Pressure Processing: Effectiveness, Mechanism, and Potential Application in the Fresh Produce Industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(5):1862-71.
2. Huang H-W, Lung H-M, Yang BB, Wang C-Y. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*. 2014;40:250-9.
3. Pereira RN, Vicente AA. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*. 2010;43(7):1936-43.
4. Kovac K, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Raspor P, Rodriguez-Lazaro D. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(11):558-68.
5. Black EP, Cascarino J, Guan D, Kniel KE, Hicks DT, Pivarnik LF, Hoover DG. Coliphage as pressure surrogates for enteric viruses in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010;11(2):239-44.
6. Guan D, Kniel K, Calci KR, Hicks DT, Pivarnik LF, Hoover DG. Response of four types of coliphages to high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*. 2006;23(6):546-51.
7. Raoult D, Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(4):315-9.
8. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. 2003;154(4):245-51.
9. Fortier L-C, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;4(5):354-65.
10. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(3):649-59.
11. Singh A, Poshtiban S, Evoy S. Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection. *Sensors*. 2013;13(2):1763-86.
12. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2005;11(5):211-9.
13. Golais F, Holly J, Vitkovska J. Coevolution of bacteria and their viruses. *Folia Microbiologica*. 2013;58(3):177-86.
14. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60(11):2356-70.
15. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*. 2011;1(4):298-303.
16. Marks T, Sharp R. Bacteriophages and biotechnology: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2000;75(1):6-17.
17. Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(1):5-21.
18. Hanlon GW. Bacteriophages: An appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;30(2):118-28.
19. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*. 2001;146(5):843-57.
20. Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(1):7-13.

21. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*. 2012;9.
22. Aksyuk AA, Rossmann MG. Bacteriophage Assembly. *Viruses-Basel*. 2011;3(3):172-203.
23. Adams MH. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers; 1959.
24. Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. *Cell*. 2004;118(4):419-29.
25. Leiman PG, Arisaka F, van Raaij MJ, Kostyuchenko VA, Aksyuk AA, Kanamaru S, Rossmann MG. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology Journal*. 2010;7.
26. Rossmann MG, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Leiman PG. The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004;14(2):171-80.
27. Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*. 2007;152(2):227-43.
28. Aksyuk AA, Leiman PG, Kurochkina LP, Shneider MM, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *Embo Journal*. 2009;28(7):821-9.
29. Ackermann H-W, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Research in Microbiology*. 2007;158(7):555-66.
30. Court DL, Opperttheim AB, Adhya SL. A new look at bacteriophage lambda genetic networks. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(2):298-304.
31. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*. 2005;13(10):491-6.
32. Young I, Wang I, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in microbiology*. 2000;8(3):120-8.
33. Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*. 2000;54:799-825.
34. Cochran PK, Kellogg CA, Paul JH. Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Marine Ecology Progress Series*. 1998;164:125-33.
35. Middelboe M, Hagstrom A, Blackburn N, Sinn B, Fischer U, Borch NH, Pinhassi J, Simu K, Lorenz MG. Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microbial Ecology*. 2001;42(3):395-406.
36. Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut microbes*. 2013;4(1):4-16.
37. Cummings DJ, Kusy AR, Chapman VA, Delong SS, Stone KR. Characterization of T-even bacteriophage substructures .1. Tail fibers and tail tubes. *Journal of Virology*. 1970;6(4):534-&.
38. Petrov VM, Ratnayaka S, Nolan JM, Miller ES, Karam JD. Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology Journal*. 2010;7.
39. Rao VB, Black LW. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology Journal*. 2010;7.
40. Yoichi M, Abe M, Miyanaga K, Unno H, Tanji Y. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect Escherichia coli O157 : H7. *Journal of Biotechnology*. 2005;115(1):101-7.

41. Hancock REW, Reeves P. Lipopolysaccharide-deficient, bacteriophage-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 1976;127(1):98-108.
42. Leistner L, Gorris LGM. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6(2):41-6.
43. Ludikhuyze L, Van Loey A, Indrawati, Denys S, Hendrickx MEG. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. 2002:115-66.
44. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1999;50(1-2):1-17.
45. Gould GW. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. 1996;33(1):51-64.
46. Lado BH, Yousef AE. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*. 2002;4(4):433-40.
47. Raso J, Barbosa-Canovas GV. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003;43(3):265-85.
48. Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;55(1-3):181-6.
49. Sagar VR, Kumar SP. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2010;47(1):15-26.
50. Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. 2004;14(4):273-85.
51. Rahman MS, Guizani N, Al-Ruzeiki MH. D- and Z-values of microflora in tuna mince during moist- and dry-heating. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*. 2004;37(1):93-8.
52. Phungamngoen C, Chiewchan N, Devahastin S. Thermal resistance of *Salmonella enterica* serovar Anatum on cabbage surfaces during drying: Effects of drying methods and conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;147(2):127-33.
53. Tucker G. A novel validation method: Application of time-temperature integrators to food pasteurization treatments. *Food and Bioproducts Processing*. 1999;77(C3):223-31.
54. Lemmens L, Colle I, Knockaert G, Van Buggenhout S, Van Loey A, Hendrickx M. Influence of pilot scale in pack pasteurization and sterilization treatments on nutritional and textural characteristics of carrot pieces. *Food Research International*. 2013;50(2):526-33.
55. Reddy NR, Tetzloff RC, Solomon HM, Larkin JW. Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2006;7(3):169-75.
56. Feng K, Divers E, Ma Y, Li J. Inactivation of a Human Norovirus Surrogate, Human Norovirus Virus-Like Particles, and Vesicular Stomatitis Virus by Gamma Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(10):3507-17.
57. Earnshaw RG, Appleyard J, Hurst RM. Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 1995;28(2):197-219.
58. Fernandes A, Antonio AL, Barreira JCM, Luisa Botelho M, Oliveira MBPP, Martins A, Ferreira ICFR. Effects of Gamma Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lactarius deliciosus* L. Wild Edible Mushroom. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;6(10):2895-903.

59. Walkling-Ribeiro M, Rodriguez-Gonzalez O, Jayaram S, Griffiths MW. Microbial inactivation and shelf life comparison of 'cold' hurdle processing with pulsed electric fields and microfiltration, and conventional thermal pasteurisation in skim milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;144(3):379-86.
60. Grahl T, Markl H. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45(1-2):148-57.
61. Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD. High-pressure processing - effects on microbial food safety and food quality. *Fems Microbiology Letters*. 2008;281(1):1-9.
62. Yordanov DG, Angelova GV. High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010;24(3):1940-5.
63. Zhou GH, Xu XL, Liu Y. Preservation technologies for fresh meat - A review. *Meat Science*. 2010;86(1):119-28.
64. Mujica-Paz H, Valdez-Fragoso A, Tonello Samson C, Welte-Chanes J, Antonio Torres J. High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*. 2011;4(6):969-85.
65. Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(1):69-112.
66. San Martin MF, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42(6):627-45.
67. Li X, Chen H, Kingsley DH. The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI.1 and GII.4 human noroviruses. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;167(2):138-43.
68. Heinz V, Buckow R. Food preservation by high pressure. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2010;5(1):73-81.
69. Torres JA, Velazquez G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*. 2005;67(1-2):95-112.
70. Hugas M, Garriga M, Monfort JM. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*. 2002;62(3):359-71.
71. Knorr D, Froehling A, Jaeger H, Reineke K, Schlueter O, Schoessler K. Emerging Technologies in Food Processing. In: Doyle MP, Klaenhammer TR, editors. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 2. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2011. p. 203-35.
72. Silva JL, Foguel D, DaPoian AT, Prevelige PE. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Current Opinion in Structural Biology*. 1996;6(2):166-75.
73. Kingsley DH, Li X, Chen H. Temperature Effects for High-Pressure Processing of Picornaviruses. *Food and Environmental Virology*. 2014;6(1):58-61.
74. Smiddy M, Kelly AL, Patterson MF, Hill C. High pressure-induced inactivation of Q beta coliphage and c2 phage in oysters and in culture media. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(2):105-10.
75. Grove SF, Forsyth S, Wan J, Coventry J, Cole M, Stewart CM, Lewis T, Ross T, Lee A. Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):206-10.

76. Kingsley DH, Chen HQ, Hoover DG. Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus Research*. 2004;102(2):221-4.
77. Kingsley DH, Hollinian DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(2):581-5.
78. Calci KR, Meade GK, Tezloff RC, Kingsley DH. High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(1):339-43.
79. Silva JL, Oliveira AC, Gomes AMO, Lima L, Mohana-Borges R, Pacheco ABF, Foguel D. Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002;1595(1-2):250-65.
80. Tang Q, Li D, Xu J, Wang J, Zhao Y, Li Z, Xue C. Mechanism of inactivation of murine norovirus-1 by high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;137(2-3):186-9.
81. Murchie LW, Kelly AL, Wiley M, Adair BM, Patterson M. Inactivation of a calicivirus and enterovirus in shellfish by high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2007;8(2):213-7.
82. Oliveira AC, Ishimaru D, Goncalves RB, Smith TJ, Mason P, Sa-Carvalho D, Silva JL. Low temperature and pressure stability of picornaviruses: Implications for virus uncoating. *Biophysical Journal*. 1999;76(3):1270-9.
83. Hirneisen KA, Hoover DG, Hicks DT, Pivarnik LF, Kniel KE. Pressure Inactivation of Enteric Viruses in a Seafood Salad-Like Product. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2012;21(5):455-67.
84. Li D, Tang Q, Wang J, Wang Y, Zhao Q, Xue C. Effects of high-pressure processing on murine norovirus-1 in oysters (*Crassostrea gigas*) in situ. *Food Control*. 2009;20(11):992-6.
85. Kovac K, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D. Effect of high hydrostatic pressure processing on norovirus infectivity and genome stability in strawberry puree and mineral water. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;152(1-2):35-9.
86. Kingsley DH, Calci K, Holliman S, Dancho B, Flick G. High Pressure Inactivation of HAV Within Oysters: Comparison of Shucked Oysters with Whole-In-Shell Meats. *Food and Environmental Virology*. 2009;1(3-4):137-40.
87. Guan D, Joerger RD, Kniel KE, Calci KR, Hicks DT, Pivarnik LF, Hoover DG. Effect of high hydrostatic pressure on four genotypes of F-specific RNA bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;102(1):51-6.
88. Sharma M, Shearer AEH, Hoover DG, Liu MN, Solomon MB, Kniel KE. Comparison of hydrostatic and hydrodynamic pressure to inactivate foodborne viruses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(4):418-22.
89. Muller-Merbach M, Rauscher T, Hinrichs J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *International Dairy Journal*. 2005;15(6-9):777-84.
90. Kingsley DH, Chen H. Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;130(1):61-4.
91. Terio V, Tantillo G, Martella V, Di Pinto P, Buonavoglia C, Kingsley DH. High Pressure Inactivation of HAV Within Mussels. *Food and Environmental Virology*. 2010;2(2):83-8.

92. Kovac K, Bouwknecht M, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D. Evaluation of high hydrostatic pressure effect on human adenovirus using molecular methods and cell culture. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;157(3):368-74.
93. Lou F, Neetoo H, Li J, Chen H, Li J. Lack of Correlation between Virus Barosensitivity and the Presence of a Viral Envelope during Inactivation of Human Rotavirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Avian Metapneumovirus by High-Pressure Processing. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(24):8538-47.
94. Li X, Ye M, Neetoo H, Golovan S, Chen H. Pressure inactivation of Tulane virus, a candidate surrogate for human norovirus and its potential application in food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;162(1):37-42.
95. Santos JLR, Bispo JAC, Landini GF, Bonafe CFS. Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure. *Biophysical Chemistry*. 2004;111(1):53-61.
96. Seo K, Lee JE, Lim MY, Ko G. Effect of Temperature, pH, and NaCl on the Inactivation Kinetics of Murine Norovirus. *Journal of Food Protection*. 2012;75(3):533-40.
97. Costa L, Faustino MAF, Neves MGPMS, Cunha A, Almeida A. Photodynamic Inactivation of Mammalian Viruses and Bacteriophages. *Viruses-Basel*. 2012;4(7):1034-74.
98. Chen HQ, Hoover DG, Kingsley DH. Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Journal of Food Protection*. 2005;68(11):2389-94.
99. Lou F, Huang P, Neetoo H, Gurtler JB, Niemira BA, Chen H, Jiang X, Li J. High-Pressure Inactivation of Human Norovirus Virus-Like Particles Provides Evidence that the Capsid of Human Norovirus Is Highly Pressure Resistant. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(15):5320-7.
100. Goncalves RB, Mendes YS, Soares MR, Katpally U, Smith TJ, Silva JL, Oliveira AC. VP4 protein from human rhinovirus 14 is released by pressure and locked in the capsid by the antiviral compound WIN. *Journal of Molecular Biology*. 2007;366(1):295-306.
101. Jonczyk E, Klak M, Miedzybrodzki R, Gorski A. The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*. 2011;56(3):191-200.
102. Kerby GP, Gowdy RA, Dillon ES, Dillon ML, Csaky TZ, Sharp DG, Beard JW. Purification, pH stability and sedimentation properties of the bacteriophage-T7 of *Escherichia- Coli*. *Journal of Immunology*. 1949;63(1):93-107.
103. Avsaroglu MD, Bozoglu F, Akcelik M, Bayindirli A. Effect of high pressure on lactococcal bacteriophages. *Journal of Food Safety*. 2009;29(1):26-36.
104. Erkmén O, Dogan C. Kinetic analysis of *Escherichia coli* inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods. *Food Microbiology*. 2004;21(2):181-5.
105. Palou E, LopezMalo A, BarbosaCanovas GV, WeltiChanes J, Swanson BG. Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1997;30(7):703-8.
106. Klotz B, Pyle DL, Mackey BM. New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(8):2468-78.
107. Pandey PK, Ramaswamy HS, Idziak E. High pressure destruction kinetics of indigenous microflora and *Escherichia coli* in raw milk at two temperatures. *Journal of Food Process Engineering*. 2003;26(3):265-83.

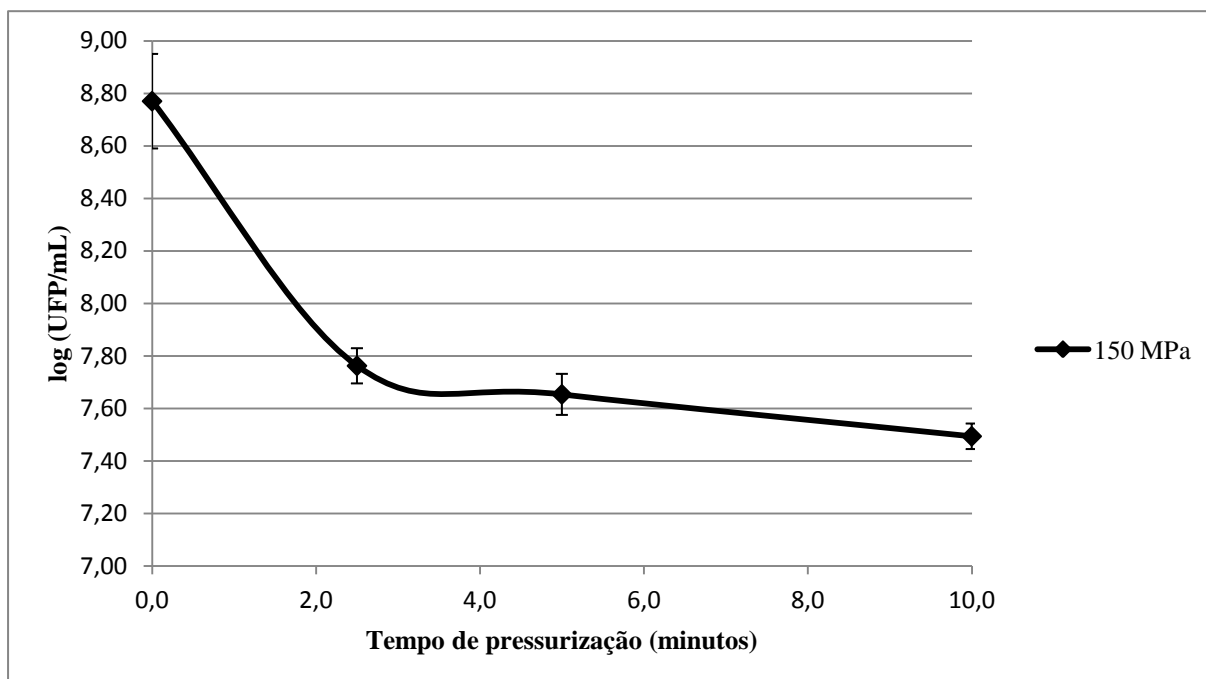


108. Erkmen O. High hydrostatic pressure inactivation kinetics of *Salmonella typhimurium*. *High Pressure Research*. 2009;29(1):129-40.
109. Dogan C, Erkmen O. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering*. 2004;62(1):47-52.

[ 7 Anexos ]

Tabela 1: Dados experimentais para 150 MPa a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log10 (UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
150	2,5	$10^{-5}$	58	5,80E+07	7,76	7,76	0,07
			62	6,20E+07	7,79		
			72	7,20E+07	7,85		
			60	6,00E+07	7,77		
			53	5,30E+07	7,72		
			71	7,10E+07	7,85		
			45	4,50E+07	7,65		
			50	5,00E+07	7,69		
			55	5,50E+07	7,74		
	5	$10^{-5}$	48	4,80E+07	7,68	7,65	0,08
			43	4,30E+07	7,63		
			35	3,50E+07	7,54		
			59	5,90E+07	7,77		
			43	4,30E+07	7,63		
			51	5,10E+07	7,70		
			36	3,60E+07	7,55		
			41	4,10E+07	7,61		
			55	5,50E+07	7,74		
	10	$10^{-4}$	304	3,04E+07	7,48	7,49	0,05
			297	2,97E+07	7,47		
			317	3,17E+07	7,50		
			283	2,83E+07	7,45		
			283	2,83E+07	7,45		
			269	2,69E+07	7,42		
			348	3,48E+07	7,54		
			375	3,75E+07	7,57		
			345	3,45E+07	7,53		



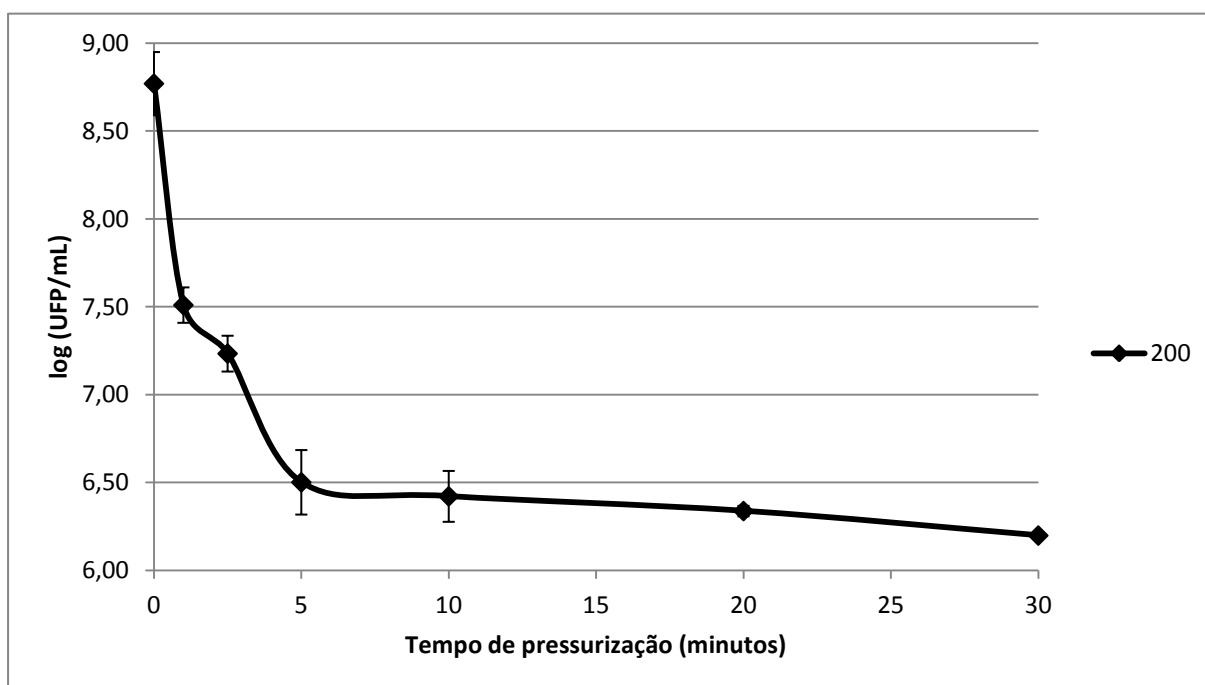
**Figura 1:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 150 MPa a 25 °C.

**Tabela 2:** Dados experimentais para 200 MPa 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão	Tempo	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log (UFP/mL)	Média	Desvio padrão
200	1	10 <sup>-5</sup>	20	2,00E+07	7,30	7,51	0,10
			33	3,30E+07	7,51		
			29	2,90E+07	7,46		
			30	3,00E+07	7,47		
			43	4,30E+07	7,63		
			43	4,30E+07	7,63		
			31	3,10E+07	7,49		
			32	3,20E+07	7,50		
			37	3,70E+07	7,56		
	2,5	10 <sup>-4</sup>	209	2,09E+07	7,32	7,23	0,102
			219	2,19E+07	7,34		
			175	1,75E+07	7,24		

			121	1,21E+07	7,08		
			143	1,43E+07	7,15		
			147	1,47E+07	7,16		
			252	2,52E+07	7,40		
			156	1,56E+07	7,19		
			159	1,59E+07	7,20		
	5	10 <sup>-3</sup>	141	1,41E+06	6,14	6,50	0,18
			316	3,16E+06	6,49		
			186	1,86E+06	6,26		
			224	2,24E+06	6,35		
			170	1,70E+06	6,23		
			270	2,70E+06	6,43		
			262	2,62E+06	6,41		
			214	2,14E+06	6,33		
		10 <sup>-4</sup>	46	4,60E+06	6,66		
			53	5,30E+06	6,72		
			47	4,70E+06	6,67		
			42	4,20E+06	6,62		
			55	5,50E+06	6,74		
			43	4,30E+06	6,63		
			37	3,70E+06	6,56		
			42	4,20E+06	6,62		
			40	4,00E+06	6,60		
	10	10 <sup>-4</sup>	23	2,30E+06	6,36	6,42	0,14
			16	1,60E+06	6,20		
			28	2,80E+06	6,44		
			46	4,60E+06	6,66		
			21	2,10E+06	6,32		
			30	3,00E+06	6,47		
			30	3,00E+06	6,47		
	20	10 <sup>-3</sup>	218	2,18E+06	6,33	6,34	0,03
			206	2,06E+06	6,31		
			250	2,50E+06	6,39		
			211	2,11E+06	6,32		

	30	$10^{-3}$	225	2,25E+06	6,35	6,20	0,02
			205	2,05E+06	6,31		
			213	2,13E+06	6,32		
			165	1,65E+06	6,21		
			164	1,64E+06	6,21		
			156	1,56E+06	6,19		
			160	1,60E+06	6,20		
			146	1,46E+06	6,16		
			158	1,58E+06	6,19		



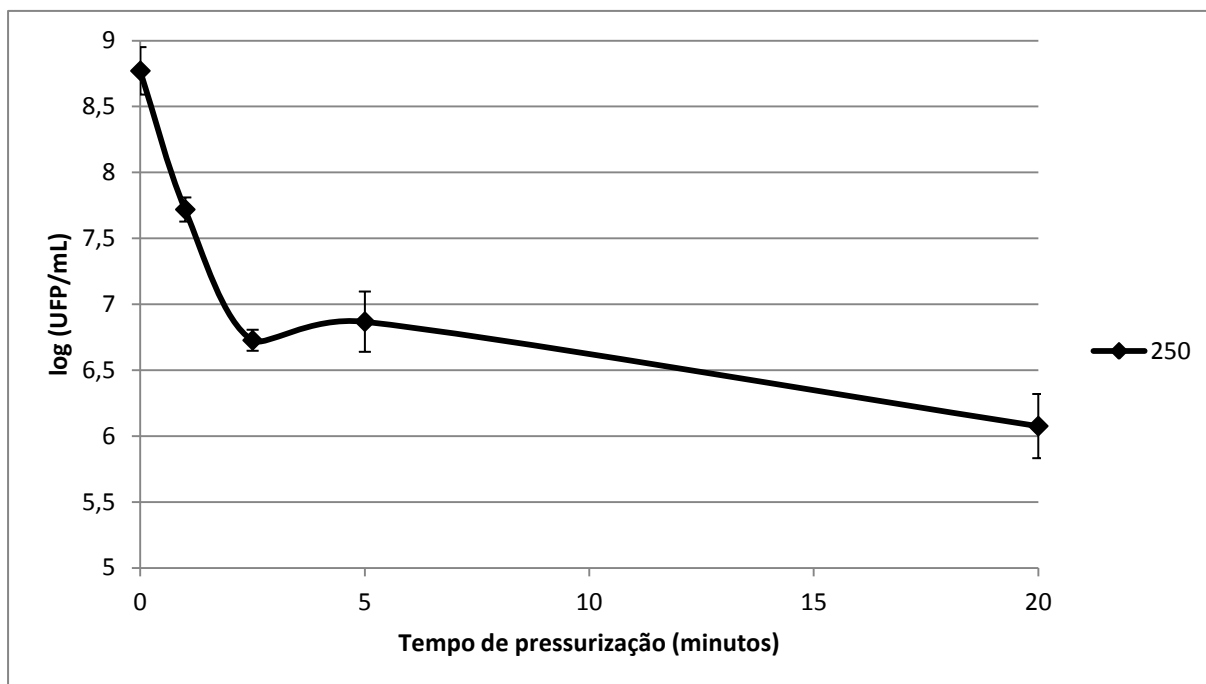
**Figura 2:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 200 MPa a 25 °C.

**Tabela 3:** Dados experimentais para 250 MPa a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log(UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
250	1	$10^{-5}$	52	5,20E+07	7,71	7,71	0,091
			40	4,00E+07	7,60		

			35	3,50E+07	7,54		
			54	5,40E+07	7,73		
			60	6,00E+07	7,77		
			62	6,20E+07	7,79		
			65	6,50E+07	7,81		
			50	5,00E+07	7,69		
			61	6,10E+07	7,78		
	2,5	10 <sup>-4</sup>	73	7,30E+06	6,84	6,72	0,079
			56	5,60E+06	6,74		
			44	4,40E+06	6,64		
			39	3,90E+06	6,59		
			46	4,60E+06	6,66		
			53	5,30E+06	6,72		
			60	6,00E+06	6,77		
			61	6,10E+06	6,78		
			57	5,70E+06	6,75		
	5	10 <sup>-4</sup>	73	7,30E+06	6,86	6,86	0,22
			97	9,70E+06	6,98		
			73	7,30E+06	6,86		
			80	8,00E+06	6,90		
			81	8,10E+07	6,90		
			78	7,80E+06	6,89		
			118	1,18E+07	7,07		
			133	1,33E+07	7,12		
		10 <sup>-4</sup>	80	8,00E+06	6,90		
			33	3,30E+06	6,51		
			130	1,30E+07	7,11		
			123	1,23E+07	7,08		
			25	2,50E+06	6,39		
			30	3,00E+06	6,47		
			78	7,80E+06	6,89		
	20	10 <sup>-3</sup>	61	6,10E+05	5,78	6,07	0,24
			97	9,70E+05	5,98		
			33	3,30E+05	6,51		

			101	1,01E+06	6,00		
			131	1,31E+06	6,11		
			109	1,09E+06	6,03		



**Figura 3:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 250 MPa a 25 °C.

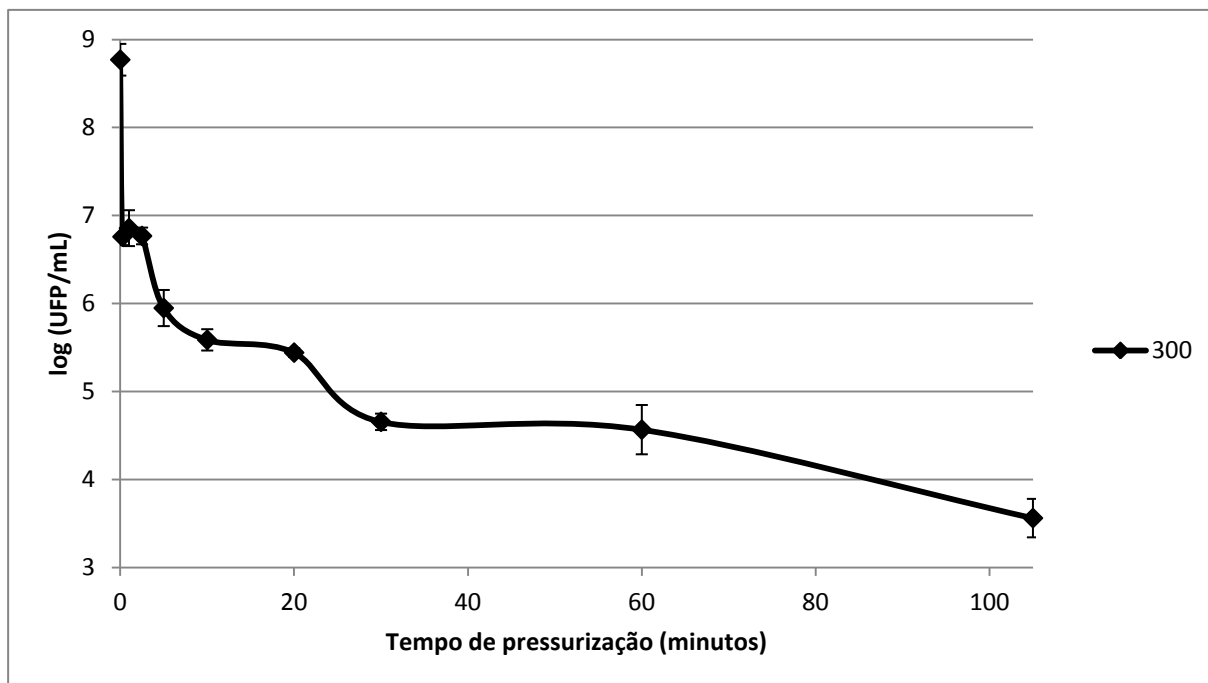
**Tabela 4:** Dados experimentais para 300 MPa a a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	Log(UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
300	0,25	$10^{-4}$	64	6,40E+06	6,81	6,76	0,10
			68	6,80E+06	6,83		
			65	6,50E+06	6,81		
			75	7,50E+06	6,88		
			50	5,00E+06	6,70		
			44	4,40E+06	6,64		
			44	4,40E+06	6,64		
	1	1	40	4,00E+06	6,60	6,86	0,20



		$0^{-4}$	77	7,70E+06	6,89		
			34	3,40E+06	6,53		
			108	1,08E+07	7,03		
			92	9,20E+06	6,96		
			98	9,80E+06	6,99		
			97	9,70E+06	6,99		
	2,5	$10^{-4}$	80	8,00E+06	6,90	6,77	0,09
			48	4,80E+06	6,68		
			79	7,90E+06	6,90		
			49	4,90E+06	6,69		
			52	5,20E+06	6,72		
			52	5,20E+06	6,72		
			59	5,90E+06	6,77		
	5	$10^{-3}$	130	1,30E+06	6,11	5,95	0,21
			142	1,42E+06	6,15		
			166	1,66E+06	6,22		
			121	1,21E+06	6,08		
			160	1,60E+06	6,20		
			143	1,43E+06	6,16		
			199	1,99E+06	6,30		
			83	8,30E+05	5,92		
			90	9,00E+05	5,95		
			110	1,10E+06	6,04		
			77	7,70E+05	5,89		
			71	7,10E+05	5,85		
			43	4,30E+05	5,63		
			66	6,60E+05	5,82		
			57	5,70E+05	5,76		
			48	4,80E+05	5,68		
			62	6,20E+05	5,79		
			50	5,00E+05	5,70		
			58	5,80E+05	5,76		
	10	$10^{-3}$	52	5,20E+05	5,72	5,59	0,12
			60	6,00E+05	5,78		

			37	3,70E+05	5,57		
			31	3,10E+05	5,49		
			36	3,60E+05	5,56		
			27	2,70E+05	5,43		
			37	3,70E+05	5,57		
	20	10 <sup>-2</sup>	271	2,71E+05	5,43	5,44	0,05
			295	2,95E+05	5,47		
			329	3,29E+05	5,52		
			273	2,73E+05	5,44		
			236	2,36E+05	5,37		
			300	3,00E+05	5,48		
			245	2,45E+05	5,39		
	30	10 <sup>-2</sup>	41	4,10E+04	4,61	4,66	0,09
			32	3,20E+04	4,51		
			50	5,00E+04	4,70		
			40	4,00E+04	4,60		
			50	5,00E+04	4,70		
			63	6,30E+04	4,80		
			47	4,70E+04	4,67		
	60	10 <sup>-2</sup>	34	3,40E+04	4,53	4,57	0,28
			12	1,20E+04	4,08		
			38	3,80E+04	4,58		
			25	2,50E+04	4,40		
			41	4,10E+04	4,61		
			78	7,80E+04	4,89		
			75	7,50E+04	4,88		
	105	10 <sup>0</sup>	740	7,40E+03	3,87	3,56	0,22
			228	2,28E+03	3,36		
			252	2,52E+03	3,40		
			188	1,88E+03	3,27		
			520	5,20E+03	3,72		
			444	4,44E+03	3,65		
			464	4,64E+03	3,67		



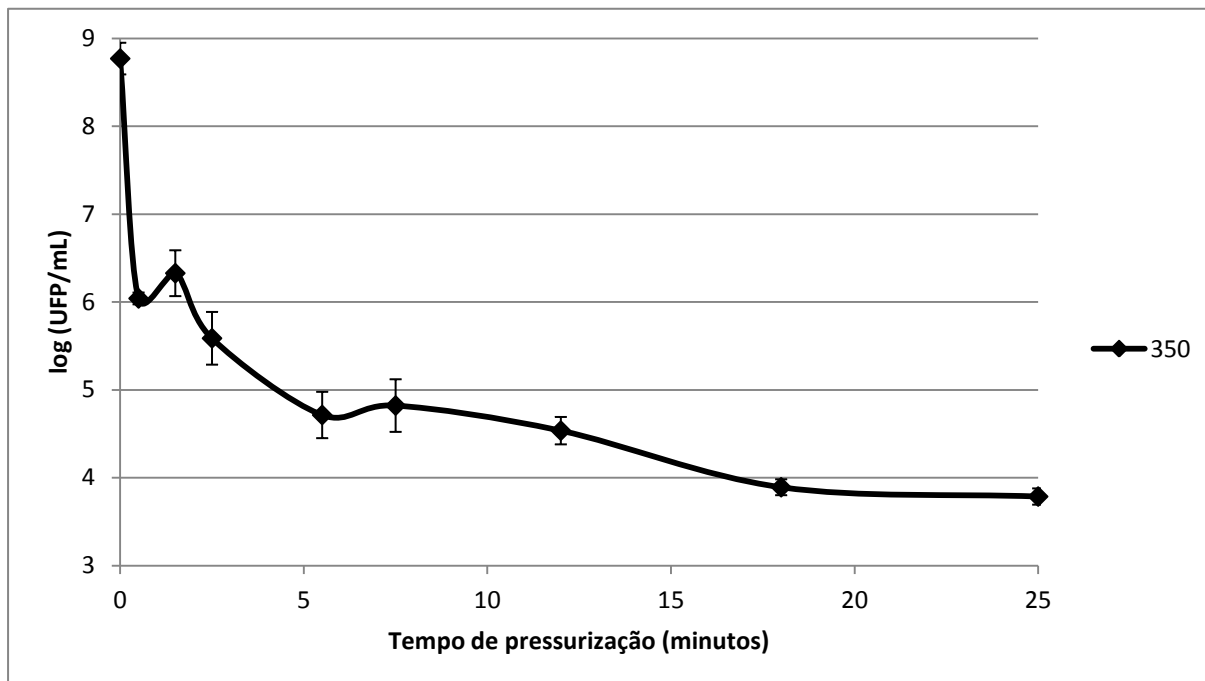
**Figura 4:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 300 MPa a 25 °C.

**Tabela 5:** Dados experimentais para 350 MPa a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log(UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
350	0,5	$10^{-3}$	123	1,23E+06	6,09	6,04	0,07
			103	1,03E+06	6,01		
			112	1,12E+06	6,05		
			127	1,27E+06	6,10		
			128	1,28E+06	6,11		
			84	8,40E+05	5,92		
			99	9,90E+05	6,00		
	1,5	$10^{-3}$	106	1,06E+06	6,03	6,33	0,26

			99	9,90E+05	6,00		
			368	3,68E+06	6,57		
			388	3,88E+06	6,59		
			164	1,64E+06	6,21		
			388	3,88E+06	6,59		
			206	2,06E+06	6,31		
	2,5	$10^{-3}$	169	1,69E+06	6,23	5,59	0,30
			93	9,30E+05	5,97		
			88	8,80E+05	5,94		
			48	4,80E+05	5,68		
			43	4,30E+05	5,63		
			31	3,10E+05	5,49		
		$10^{-2}$	192	1,92E+05	5,28		
			192	1,92E+05	5,28		
			212	2,12E+05	5,33		
			240	2,40E+05	5,38		
			220	2,20E+05	5,34		
			280	2,80E+05	5,45		
			416	4,16E+05	5,62		
	5,5	$10^{-2}$	44	4,40E+04	4,64	4,71	0,26
			46	4,60E+04	4,66		
			44	4,40E+04	4,64		
			56	5,60E+04	4,75		
			28	2,80E+04	4,45		
			38	3,80E+04	4,58		
			188	1,88E+05	5,27		
	7,5	$10^{-2}$	52	5,20E+04	4,72	4,82	0,30
			77	7,70E+04	4,89		
			120	1,20E+05	5,08		
			143	1,43E+05	5,16		
			109	1,09E+05	5,04		
			30	3,00E+04	4,48		
			25	2,50E+04	4,40		
	12	$10^{-1}$	197	1,97E+04	4,29	4,54	0,16

			217	2,17E+04	4,34		
			474	4,74E+04	4,68		
			435	4,35E+04	4,64		
			397	3,97E+04	4,60		
			358	3,58E+04	4,55		
			449	4,49E+04	4,65		
	18	$10^{-1}$	119	1,19E+04	4,08	3,89	0,09
			70	7,00E+03	3,85		
			79	7,90E+03	3,90		
			84	8,40E+03	3,92		
			65	6,50E+03	3,81		
			74	7,40E+03	3,87		
			66	6,60E+03	3,82		
	25	$10^0$	488	4,88E+03	3,69	3,79	0,09
			584	5,84E+03	3,77		
			676	6,76E+03	3,83		
			444	4,44E+03	3,65		
			812	8,12E+03	3,91		
			644	6,44E+03	3,81		
			712	7,12E+03	3,85		



**Figura 5:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 350 MPa a 25 °C.

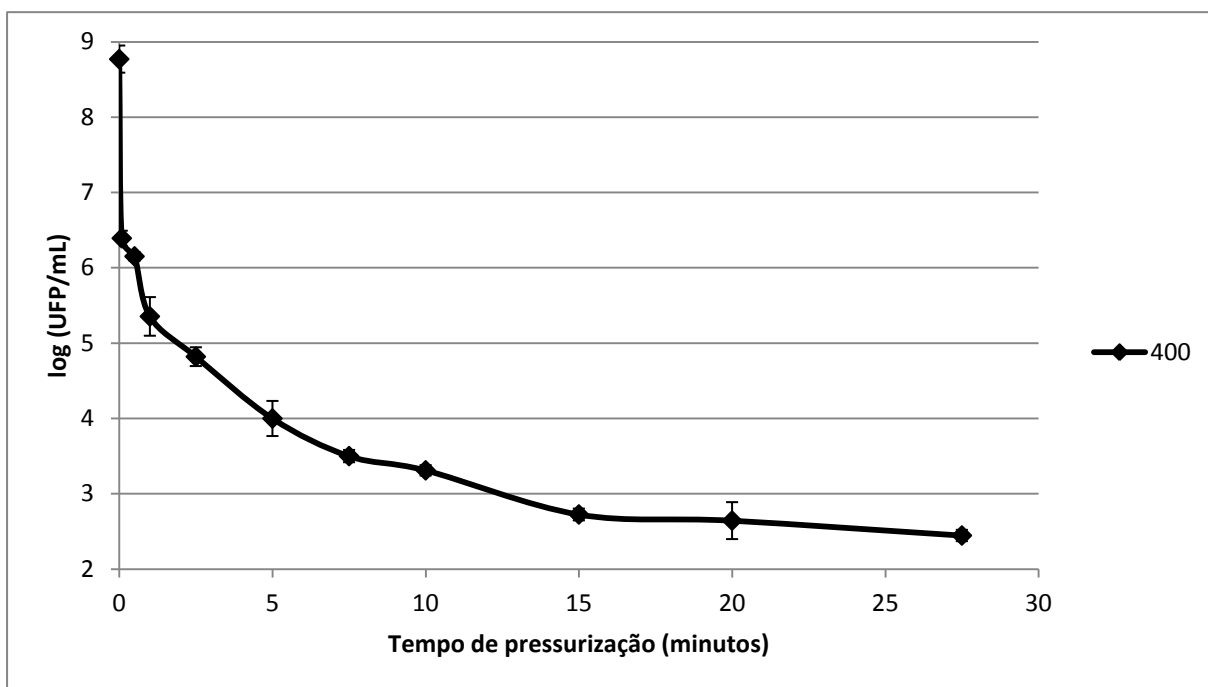
**Tabela 6:** Dados experimentais para 400 MPa a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log(UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
400	0,083	$10^{-3}$	266	2,66E+06	6,42	6,39	0,10
			284	2,84E+06	6,45		
			274	2,74E+06	6,43		
			147	1,47E+06	6,16		
			266	2,66E+06	6,42		
			265	2,65E+06	6,42		
			257	2,57E+06	6,40		
	0,50	$10^{-3}$	118	1,18E+06	6,07	6,15	0,06
			134	1,34E+06	6,12		
			136	1,36E+06	6,13		
			180	1,80E+06	6,25		

			154	1,54E+06	6,18		
			136	1,36E+06	6,13		
			141	1,41E+06	6,14		
	1	$10^{-2}$	108	1,08E+05	5,03	5,35	0,26
			91	9,10E+04	4,95		
			407	4,07E+05	5,60		
			372	3,72E+05	5,57		
			300	3,00E+05	5,47		
			274	2,74E+05	5,43		
			245	2,45E+05	5,38		
	2,5	$10^{-1}$	461	4,61E+04	4,66	4,82	0,12
			472	4,72E+04	4,67		
			537	5,37E+04	4,72		
			333	3,33E+04	4,52		
			366	3,66E+04	4,56		
			730	7,30E+04	4,86		
			660	6,60E+04	4,81		
	5	$10^{-1}$	178	1,78E+04	4,25	4,00	0,23
			185	1,85E+04	4,26		
			163	1,63E+04	4,21		
			75	7,50E+03	3,87		
			154	1,54E+04	4,18		
			150	1,50E+04	4,17		
			186	1,86E+04	4,26		
		$10^{-1}$	32	3,20E+03	3,50		
			75	7,50E+03	3,87		
			60	6,00E+03	3,77		
			61	6,10E+03	3,78		
			88	8,80E+03	3,94		
			78	7,80E+03	3,89		
			92	9,20E+03	3,96		
	7,5	$10^0$	444	4,44E+03	3,64	3,50	0,08
			308	3,08E+03	3,48		
			310	3,10E+03	3,49		

			369	3,69E+03	3,56		
			261	2,61E+03	3,41		
			277	2,77E+03	3,44		
			277	2,77E+03	3,44		
	10	10 <sup>0</sup>	258	2,58E+03	3,41	3,31	0,07
			206	2,06E+03	3,31		
			208	2,08E+03	3,31		
			166	1,66E+03	3,22		
			224	2,24E+03	3,35		
			177	1,77E+03	3,24		
	15	10 <sup>0</sup>	54	5,40E+02	2,73	2,72	0,08
			51	5,10E+02	2,70		
			61	6,10E+02	2,78		
			43	4,30E+02	2,63		
			42	4,20E+02	2,62		
			46	4,60E+02	2,66		
			64	6,40E+02	2,80		
			71	7,10E+02	2,85		
			52	5,20E+02	2,71		
	20	10 <sup>0</sup>	60	6,00E+02	2,77	2,64	0,25
			71	7,10E+02	2,85		
			66	6,60E+02	2,81		
			20	2,00E+02	2,30		
			23	2,30E+02	2,36		
			20	2,00E+02	2,30		
	27,5	10 <sup>0</sup>	34	3,40E+02	2,53	2,45	0,08
			25	2,50E+02	2,39		
			29	2,90E+02	2,46		
			31	3,10E+02	2,49		
			22	2,20E+02	2,34		



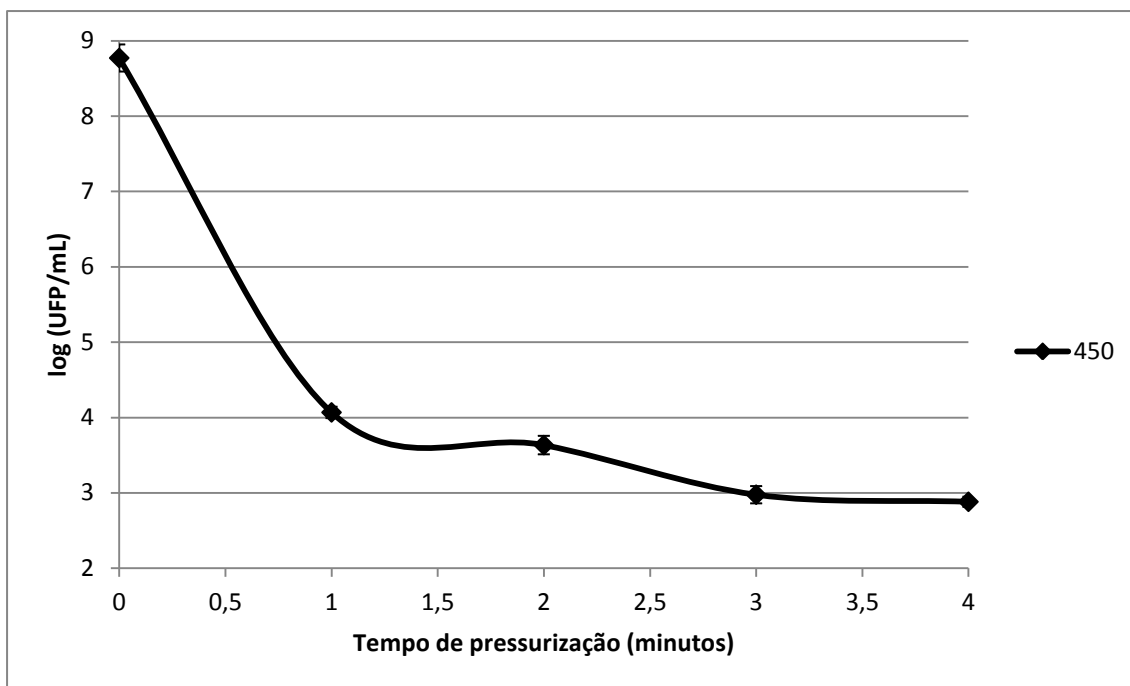


**Figura 6:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 400 MPa a 25 °C.

**Tabela 7:** Dados experimentais para 450 MPa a 25 °C no estudo do efeito da pressão e tempo de processamento.

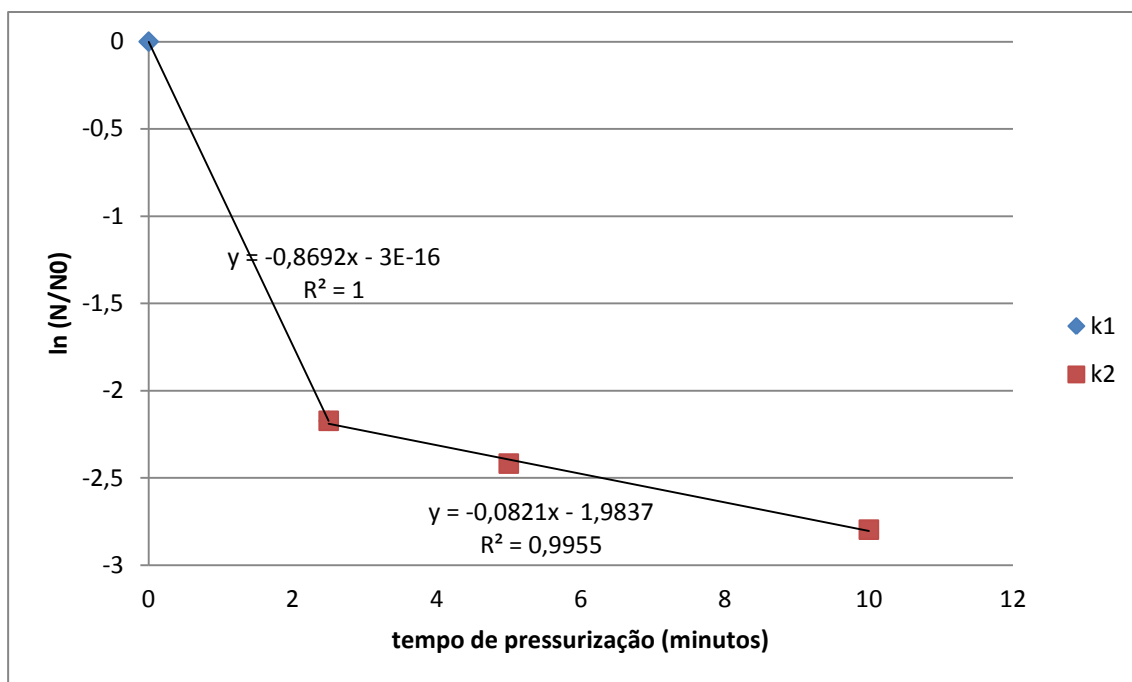
Pressão (MPa)	Tempo (minutos)	Diluições	Réplicas	UFP/mL	log(UFP/mL)	Média	Desvio Padrão
450	1	$10^{-1}$	111	1,11E+04	4,04	4,07	0,08
			107	1,07E+04	4,02		
			82	8,20E+03	3,91		
			127	1,27E+04	4,10		
			134	1,34E+04	4,12		
			116	1,16E+04	4,06		
			155	1,55E+04	4,19		
			113	1,13E+04	4,05		
			119	1,19E+04	4,07		
	2	$10^{-1}$	54	5,40E+03	3,73	3,63	0,12

			56	5,60E+03	3,74		
			55	5,50E+03	3,74		
			25	2,50E+03	3,39		
			38	3,80E+03	3,57		
			50	5,00E+03	3,69		
			36	3,60E+03	3,55		
			52	5,20E+03	3,71		
			34	3,40E+03	3,53		
	3	10 <sup>0</sup>	76	7,60E+02	2,88	2,97	0,11
			64	6,40E+02	2,80		
			101	1,01E+03	3,00		
			138	1,38E+03	3,13		
			114	1,14E+03	3,05		
			129	1,29E+03	3,11		
			97	9,70E+02	2,98		
			83	8,30E+02	2,91		
			74	7,40E+02	2,86		
	4	10 <sup>0</sup>	100	1,00E+03	3	2,88	0,07
			79	7,90E+02	2,89		
			68	6,80E+02	2,83		
			66	6,60E+02	2,81		
			71	7,10E+02	2,85		
			63	6,30E+02	2,79		
			85	8,50E+02	2,92		
			83	8,30E+02	2,91		

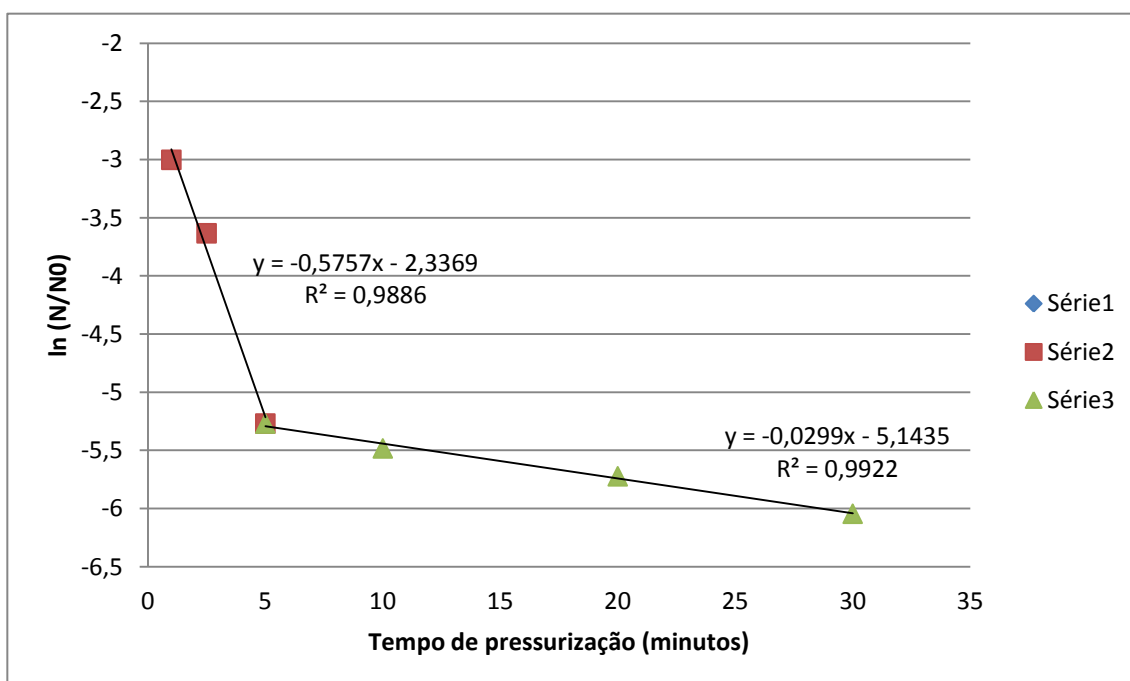


**Figura 7:** Representação gráfica da redução do título fágico em função do tempo a 450 MPa a 25 °C.

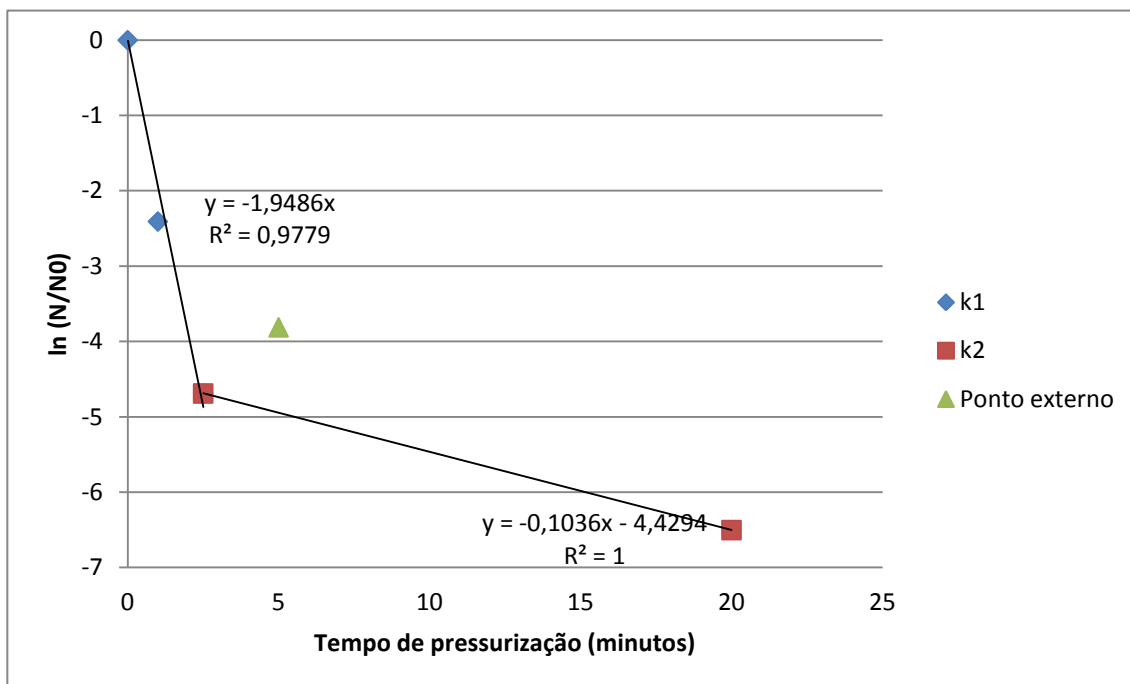
Os gráficos que se seguem foram utilizados na determinação dos valores de  $k$  para o estudo cinético da inativação do fago T4 por alta pressão.



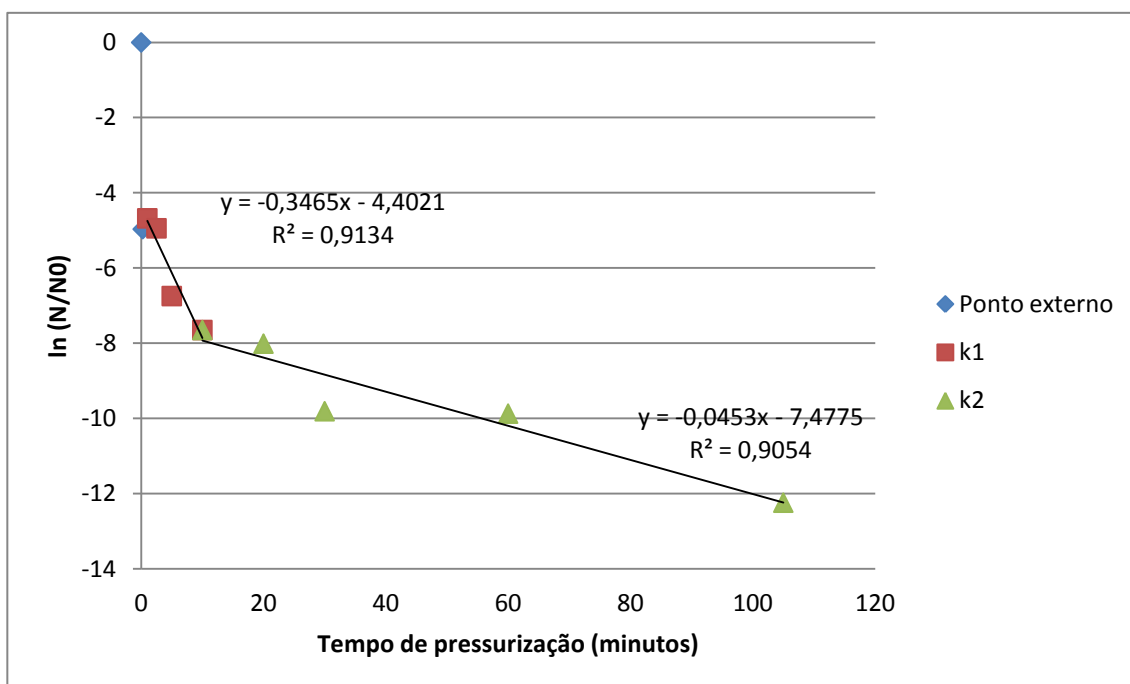
**Figura 8:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 150 MPa.



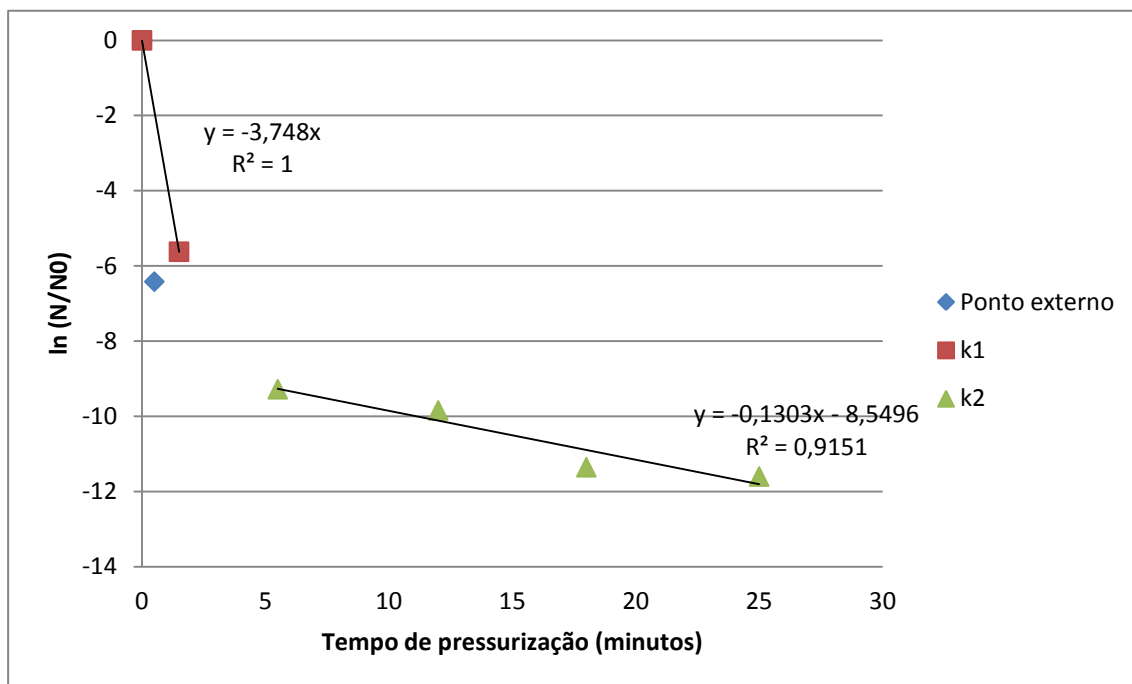
**Figura 9:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 200 MPa.



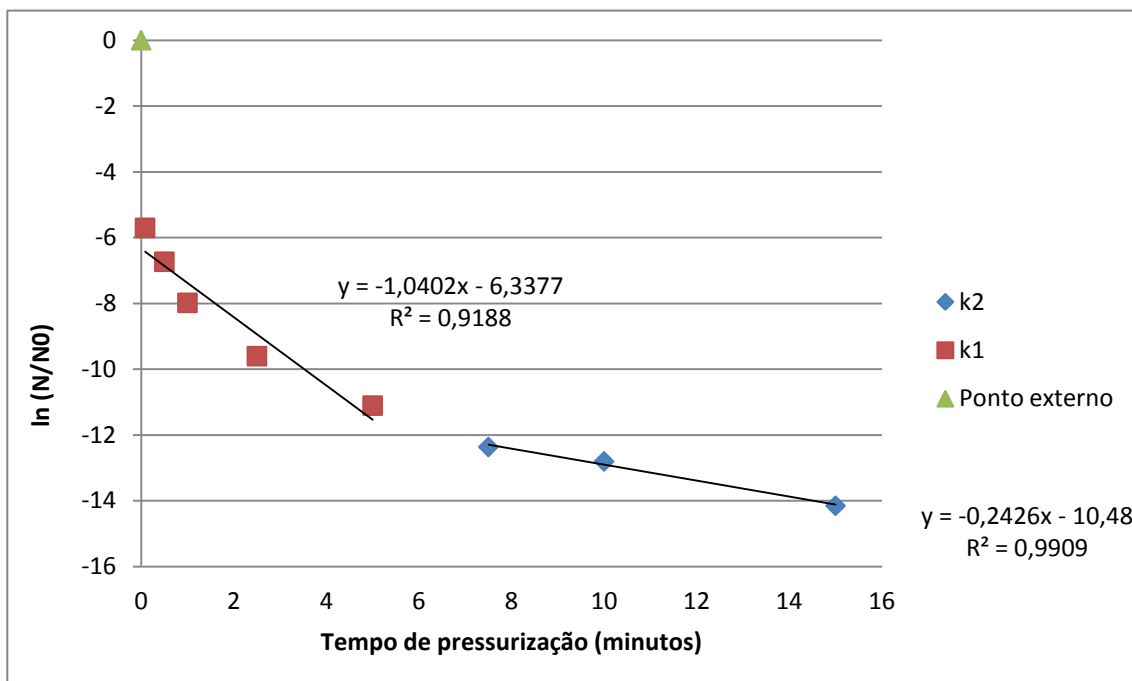
**Figura 10:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 250 MPa.



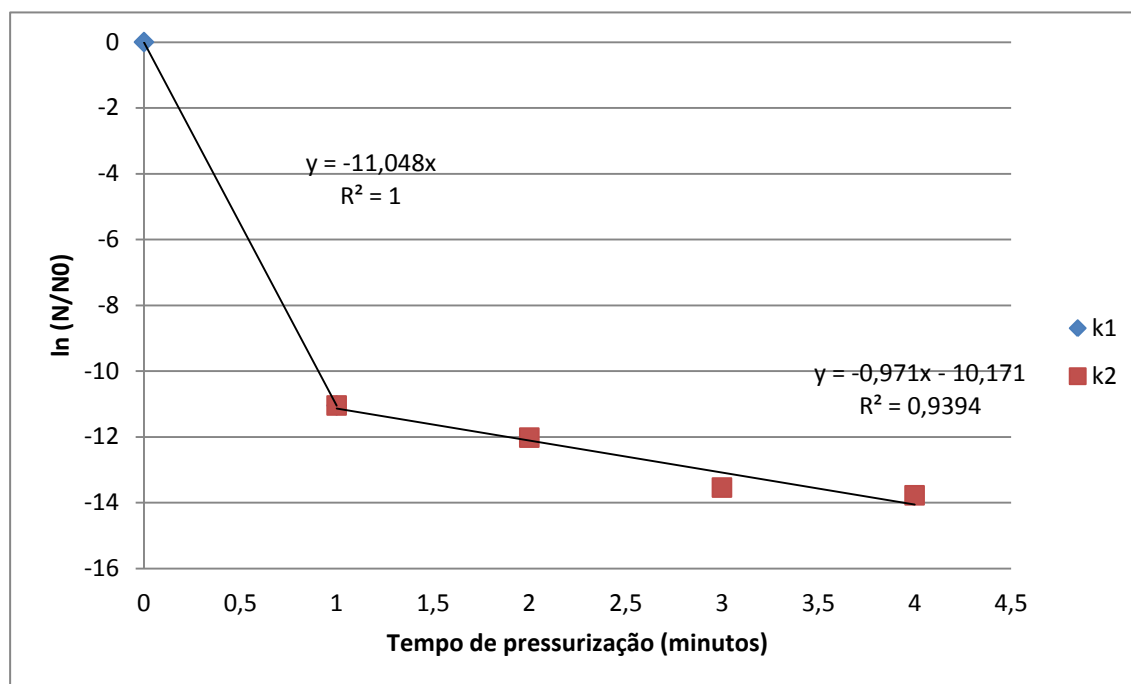
**Figura 11:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 300 MPa.



**Figura 12:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 350 MPa.



**Figura 13:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 400 MPa.



**Figura 14:** Representação de  $\ln(N/N_0)$  em função do tempo de pressurização para 450 MPa.

## Preparação de meios

### Meio TSB – 1litro

#### Preparação:

Adicionar a 30g de TSB sólido 1 litro de água destilada

Acertar o pH para 7,3

Autoclavar. Deixar arrefecer

Guardar à temperatura ambiente

### Meio TSA – 1 litro

#### Preparação:

Adicionar a 40g de TSA sólido 1 litro de água destilada

Coser o meio no microondas até ficar límpido

Acertar o pH a 7,3

Autoclavar durante 15min a 121°C

Colocar o meio de cultura em placas de petri

Guardar as placas de petri no frigorífico até serem necessárias

(Antes de ser utilizado é necessário fundir e manter a 45°C)

### **Meio TSA semi-sólido – 100ml**

#### Preparação:

Pesar 3g TSB, 0,012g  $\text{MgSO}_4$ , 0,005g  $\text{CaCl}_2$  e 0,6 g agar

Adicionar 300 ml de água destilada e dissolver

Acertar o pH a 7,3

Coser o meio no microondas até ficar límpido

Distribuir o meio por tubos de vidro, 4ml por tubo

Autoclavar durante 15min a 121°C

Colocar o meio de cultura em placas de petri

Guardar as placas de petri no frigorífico até serem necessárias

### **Meio PBS – 500ml**

#### Preparação:

Pesar 4g de  $\text{NaCl}$ ; 0,1g de  $\text{KCl}$ ; 0,72g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,12g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Adicionar 450ml de água destilada e dissolver

Ajustar o pH a 7,4

Perfazer até 500 ml

Autoclavar 15 minutos a 121°C